

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

**Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології**

До захисту допущено:
в.о. завідувача кафедри
_____ Валентина ПОЛЩУК
«__» _____ 2023 р.

**Дипломний проєкт
на здобуття ступеня бакалавра
за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
на тему: «Технологія виробництва лізату лактобацил.
Дільниця підготовки посівного матеріалу»**

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-91в
Томілко Катерина Олегівна _____

Керівник:

Доцент каф. промислової біотехнології, к.б.н., ст.н.с.
Яловенко Олена Ігорівна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:

Доцент каф. біотехніки та інженерії
Шибецький Владислав Юрійовий _____

Рецензент:

Доцент каф. біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології, к.т.н
Жукова Вероніка Сергіївна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.
Студентка _____

Київ – 2023 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	ДП 6218. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	152	
3	A1	ДП 6218. 01.000 ТК	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП 6218. 02.000 ТК	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП 6218. 03.000 ТК	Реактор з механічним перемішуючим пристроєм	1	

				ДП 6218 00.000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата			
Розробн.	Томілко К.О.			Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Керівн.	Ялоєнко О.І.				1	152
Консульт.	Шибєцький В. Ю.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-91в	
Н/контр.						
Зав.каф.	Поліщук В.Ю.					

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

в.о. завідувача кафедри

_____ Валентина ПОЛЩУК

«_ _ _» _____ 2023 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Томілко Катерини Олегівни

1. Тема проєкту «Технологія виробництва лізату лактобацил. Дільниця підготовки посівного матеріалу», керівник проєкту Яловенко Олена Ігорівна, доц., к.б.н., ст.н.с., затверджені наказом по університету від «21» березня 2020 р. № 1125-с
2. Термін подання студентом проєкту _____
3. Вихідні дані до проєкту: штам-продуцент *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06; середовище для отримання посівного матеріалу – збалансоване поживне середовище, відповідного складу; посівний апарат для вирощування посівного матеріалу – об'єм 0,1 м³; параметри культивування: $t = (39 \pm 1) ^\circ\text{C}$, анаеробні умови, $\tau = 8-16$ год; кінцевий продукт – ліофільно висушений лізат бактерій виду *Lactobacillus delbrueckii* у флаконах з широким спектром дії.
4. Зміст пояснювальної записки: обрати та навести характеристику продуцента для виробництва лізату лактобацил; визначити біохімічні основи виробництва кінцевого продукту; проаналізувати методи

створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції посівного апарату, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду посівного апарату – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1
6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Шибецький В.Ю., доц. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	19.04.23-25.04.23р.	
2.	Біохімічні основи виробництва	25.04.23-30.04.23р.	
3.	Методи отримання промислових Продуцентів	30.04.23-05.05.23р.	
4.	Технологічна частина	10.05.23-15.05.23р.	
5.	Складання апаратурної схеми	15.05.23-25.05.23р.	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	20.05.23-25.05.23р.	
7.	Оформлення пояснювальної записки та подання готової роботи на рецензію	26.05.23-30.05.23р.	
8.	Подання дипломного проєкту на рецензування	31.05.23-10.06.23р.	
9.	Подання дипломного проєкту та рецензії до екзаменаційної комісії	до 10.06.23 р.	

Студент

Катерина ТОМІЛКО

Керівник

Олена ЯЛОВЕНКО

Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва лізату
лактобацил.
Дільниця підготовки посівного матеріалу»

Київ – 2023 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт: 152 с., 18 рис., 5 табл., 90 посилань.

Дана робота присвячена розробці технології виробництва лізату лактобацил. Особливу увагу приділено підготовці посівного матеріалу.

В якості продуцента запропоновано використовувати штам *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 оскільки він має більш сильний ефект відносно патогенних мікроорганізмів.

Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуцента *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06, а також особливості виробництва, для вирощування посівного матеріалу, було розраховано та обрано обладнання, що забезпечує максимальний рівень автоматизації процесу та захисту посівної культури від можливої контамінації. Запропоновано конструкцію реактора-змішувача об'ємом 0,1 м³, що забезпечує необхідні умови для приготування необхідного поживного середовища.

Розраховано конструктивні розміри апарату та підібрано матеріали, необхідні для його виготовлення. В роботі обгрунтовані та подані технологічна та апаратурна схеми виробництва.

ЛАКТОБАЦИЛИ, ІМУНОМОДУЛЯТОР, *LACTOBACILLUS DELBRUECKII*, ПІДГОТОВКА ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ, РЕАКТОР ЗІ ЗМІШУВАЧЕМ, ЛІЗИС

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Реферат</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Томілко К.О.</i>				<i>Д</i>	<i>5</i>	<i>152</i>
<i>Консульт.</i>						<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ</i>		
<i>Керівник</i>		<i>Яловенко О.І.</i>						
<i>Затвер.</i>								

ABSTRACT

The graduation project: 152 pages, 18 figures, 5 tables, 90 references

This work is dedicated to the development of a technology for producing lactic acid bacteria lizat. Special attention is given to the preparation of the inoculum.

The strain *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 has been proposed as the producer, as it has a stronger effect against pathogenic microorganisms.

Taking into account the physiological and biochemical characteristics of the producer *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06, as well as the production specifics, the equipment has been designed and selected for growing the inoculum, ensuring a high level of process automation and protection of the culture from possible contamination. A reactor-mixer with a volume of 0.1 m³ has been proposed, which provides the necessary conditions for preparing the required nutrient medium.

The structural dimensions of the apparatus have been calculated, and the materials necessary for its production have been selected. The work provides a rationale and presents the technological and equipment diagrams for the production process.

LACTIC ACID BACTERIA, IMMUNOMODULATOR,
LACTOBACILLUS DELBRUECKII, INOCULUM PREPARATION,
REACTOR WITH MIXER, LYSIS

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Abstract</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>	<i>Томілко К.О.</i>					<i>Д</i>	<i>6</i>	<i>152</i>
<i>Консульт.</i>								
<i>Керівник</i>	<i>Ялошенко О.І.</i>					<i>КПІ ім. Ізгоря Сікорського</i>		
<i>Затвер.</i>						<i>ФБТ</i>		

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	11
1.1. Основні промислові продуценти.....	11
1.2. Систематичне положення мікроорганізму-продуценту.....	13
1.3. Морфолого-цитологічні ознаки.....	13
1.4. Культуральні ознаки.....	16
1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки.....	18
1.6. Серологічні ознаки.....	22
1.7. Поширення в природі.....	23
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	25
2.1. Характеристика кінцевого продукту.....	25
2.2. Схема хімічних перетворень.....	30
2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	35
2.4. Методи очистки цільового продукту.....	36
2.5. Механізм впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	40
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.....	42
3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	42
3.1.1. Наявність генетичних карт продуцентів або типового представника групи.....	46
3.1.2. Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу.....	51
3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту.....	53
3.2.1. Використання природного та штучного добору.....	55
3.2.2. Використання індукованого мутагенезу.....	56

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Томілко К.О.</i>			<i>Зміст</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Консульт.</i>						<i>Д</i>	<i>7</i>	<i>152</i>
<i>Керівник</i>		<i>Яловенко О.І.</i>				<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ</i>		
<i>Затвер.</i>								

3.2.3. Використання методів генної та клітинної інженерії.....	57
3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі.....	58
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	64
4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва	64
4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві	67
4.3. Опис технологічного процесу	73
4.4. Матеріальний баланс.....	102
4.5. Контроль виробництва	105
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	117
5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату	117
5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки	126
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання	139
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища	140
ВИСНОВКИ	142
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	143

ВСТУП

Загальновідомо, що імунодефіцит є поширеною проблемою сучасного суспільства. Близько 70% населення України мають первинний, вторинний або набутий імунодефіцит чи дефіцитний імунний статус, що призводить до багатьох захворювань. Безперервне руйнування людиною екосистеми, використання в медичній практиці антимікробних, хіміотерапевтичних і гормональних засобів без урахування біологічних законів поступово призводить до повної втрати нормального бактеріального внутрішнього середовища організму, симбіотичного зв'язку, який існував тисячоліттями, змінюючи функції імунної системи, ферментів і порушуючи генетичну стабільність внутрішнього середовища. Це може призвести до втрати нормального внутрішнього середовища бактерій, яке існувало тисячі років. В результаті виникають алергії, аутоімунні захворювання, кандидозні інфекції та дизбактеріози. Сьогодні лікування будь-якого захворювання неможливо охарактеризувати без урахування імунного статусу пацієнта. Застосування імуномодуляторів може сприяти більш повному і стійкому одужанню, скоротити тривалість хвороби і запобігти хронізації та рецидивуванню захворювання[1].

В дослідницьких роботах останні роки дуже важливе місце займає регуляція імунітету за допомогою біологічно активних речовин. В теперішній час достатньо велика кількість імуномодулюючих засобів перебувають на стадіях клінічних досліджень в Україні, але в терапевтичну практику увійшло всього декілька.

На основі аналізу досліджень, проведених на здорових добровольцях і пацієнтах з різними захворюваннями, можна сказати, що

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Вступ</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Томілко К.О.</i>				<i>Д</i>	<i>9</i>	<i>152</i>
<i>Консульт.</i>						<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ</i>		
<i>Керівник</i>		<i>Яловенко О.І.</i>						
<i>Затвер.</i>								

пробіотики та продукти їх метаболізму чинять імуномодулюючу дію, надаючи багатогранний вплив на функціонування імунної системи. Як лікувально-профілактичні засоби пробіотики довели свою ефективність у лікуванні захворювань, етіологією яких є порушення захисної функції слизових оболонок[1].

Тому застосування імуномодуляторів на основі пробіотиків та/або продуктів метаболізму пробіотичних бактерій у лікуванні гострих і хронічних запальних процесів можна вважати перспективним напрямком, що потребує подальшого розвитку.

Тому метою даної роботи є удосконалення технології виробництва лізатів лактобактерій з імуномодулюючою дією.

Для досягнення цієї мети були поставлені наступні завдання:

- на основі літературних даних провести пошук високопродуктивних промислових штамів, що використовуються для виробництва лізатів лактобактерій, та запропонувати їх потенційне використання;
- дослідити методи створення промислових пробіотичних штамів представників р. *Lactobacillus* та представити схему отримання високопродуктивного штаму *Lactobacillus delbrueckii*;
- оцінити біохімічні та фізико-хімічні характеристики продуцентів.
- розробити технічну та апаратурну схеми виробництва лізату лактобактерій, підібрати та забезпечити відповідне обладнання.
- обґрунтувати вибір конструкції апарату дільниці підготовки посівного матеріалу, здійснити технологічний та конструктивний розрахунок обраного апарату;
- запропонувати всі необхідні вимоги щодо захисту працівників, а також захисту навколишнього середовища на цьому виробничому об'єкті

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		10

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1 Основні промислові продуценти

Для отримання цільового продукту – лізату лактобактерій в якості продуцента було вибрано мікроорганізм роду *Lactobacillus*. Даний рід включає безспоріві, грам-позитивні паличкоподібні бактерії, зазвичай правильної форми, що є представниками нормальної мікрофлори людини. На сьогоднішній день для виробництва лікарських препаратів на основі лізатів та пробіотиків, а також молочнокислих продуктів використовують пробіотичні бактерії, наприклад штам *Lactobacillus acidophilus* CNCM 1-1225, *Lactobacillus plantarum* 8A-P3, а також *Bifidobacterium longum* PO-6.

Штам *Lactobacillus acidophilus* CNCM 1-1225 використовується в якості засобу проти діареї. Він має властивість витіснити патогенні бактерії з кишечника, особливо бактерії, які відповідальні за діарею. Даних про спектр антагоністичної активності даного штама та його стійкості до антибіотиків немає.

Штам *Bifidobacterium longum* PO-6 має кислотоутворюючу активність, а також антогонітичну активність по відношенню до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, заквашує молоко та забезпечує нормалізацію мікробіоценозів організму людини. Але він потребує складних середовищ для культивування, анаеробних умов і не

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Томілко К.О.</i>			<i>Характеристика біологічного агента</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Консульт.</i>						<i>Д</i>	<i>11</i>	<i>152</i>
<i>Керівник</i>		<i>Яловенко О.І.</i>				<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ</i>		
<i>Затвер.</i>								

являється стійким до дії екстремальних факторів[2].

Також відомий штам *Lactobacillus plantarum* 8A-P3, який використовується для виробництва пробіотика «Лактобактерин». Він використовується для лікування та профілактики захворювань шлунково-кишкового тракту. Лікувальний ефект даного пробіотика обумовлений антагоністичною активністю лактобактерій до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів.

Lactobacillus rhamnosus допомагає відновити баланс мікрофлори кишечника, витісняючи шкідливі бактерії, конкуруючи за простір і запобігаючи їхньому росту. Також зменшує частоту і тривалість діареї, в тому числі у немовлят та стимулює імунну систему організму.

Lactobacillus casei - одна з відомих пробіотичних бактерій, яка сприяє росту інших корисних бактерій і обмежує ріст різних видів патогенних бактерій, що викликають інфекції[3].

В Україні потреби у пробіотичних штамів із імуномодулювальними та інтерфероногенними властивостями переважно задовольняються за рахунок штамів закордонного походження. Наприклад, *Lactobacillus bulgaricus* CRL 423 (Center of Reference for Lactobacilli Culture Collection, Tucuman, Аргентина) та *Lactobacillus bulgaricus* LB51 (DeoDan Laboratories Ltd, Болгарія) [3,4]. Однак запропонований штам *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 відрізняється виразнішою імуномодулювальною активністю [5].

Нами було обрано штам *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 оскільки він має більш сильний ефект відносно патогенних та умовно-активних мікроорганізмів, ніж вище перераховані, а також має більш високу швидкість росту, завдяки чому можна відчутно знизити час культивування [5].

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		12

1.2 Систематичне положення мікроорганізму-продуценту

За сучасною класифікацією Кавальє-Сміта даний мікроорганізм належить до:

- За доменом – Прокаріоти,
- Царство - Бактерії,
- Тип - *Firmicutes*,
- Клас - *Bacilli*,
- Порядок - *Lactobacillales*,
- Родина - *Lactobacillaceae*,
- Род - *Lactobacillus*,
- Виду – *delbrueckii*.

Що відповідає визначенню бактерій Берджі – грам-позитивні, паличковидні правильної форми, при цьому вони не утворюють спори [6].

1.3 Морфолого-цитологічні ознаки

Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus, раніше *Lactobacillus bulgaricus* - це анаеробна до аеробної гомоферментативної молочної кислоти бактерія промислового значення, що використовується у великій кількості ферментацій харчових продуктів у всьому світі.

В межах роду *Lactobacillus* існують бактерії з різною морфологією. Більшість бактерій цього роду є прямими паличками із закругленими кінцями, розташованими в ланцюжках різної довжини або розташованими

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

поодинокі чи попарно. Деякі лактобактерії короткі, коковидні або спіралеподібні, а також довгі, ниткоподібні палички довжиною від 0,7-1,1 до 3,0-8,0 мкм, розташовані по одиноко або в ланцюжках. Довжина і вигнутість паличок зазвичай залежать від умов росту, таких як склад, температура і аерація живильного середовища, а також від кількості років культивування. Лактобактерії не утворюють ендоспор. За Грамом вони забарвлюються позитивно і стають грамнегативними зі збільшенням віку та при збільшенні кислотності.

Забарвлення за Грамом і метиленовим синім показує біполярні тільця, зернистість або лінійні смугастість цитоплазми у деяких штамів. Деякі види, наприклад, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* і *L. delbrueckii subsp. lactis*, характеризуються наявністю включень зерен волютина (метахроматин, поліфосфатні гранули).

Більшість лактобактерій нерухомі. Лише деякі види проявляють рухливість (наприклад: *L. agilis*, *L. aquaticus*, *L. capillatus*, *L. ghanensis*, *L. mali*, *L. nagelii*, *L. oeni*, *L. ruminis*, *L. satsumensis*, *L. sucicola*, *L. ivarum*, *L. vini*[7]) і можуть пересуватися за допомогою перитріхіальних джгутиків. Цікаво відзначити, що рухатися можуть не тільки поодинокі клітини, але й ланцюжки з 2-5 клітин. Рухливість сильно залежить від живильного середовища та віку культури, часто вона вперше виявляється під час виділення лактобактерій і втрачається після декількох пересівів.

Штам *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 (див. Рис. 1.1) являє собою клітини у вигляді паличок з округлими краями, розміром 0,5-1,2 × 3,0-10,0 мкм, розміщені в ланцюжки. В рідкому середовищі середній розмір ланцюжка складає 3 бацили. Бактерії - нерухомі, не утворюють спор і капсул, не мають джгутиків, грампозитивні. Для цього виду характерна наявність включень зерен волютина (метахроматина, поліфосфатних гранул) [8].

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

Як у більшості грампозитивних видів бактерій, клітинна стінка *Lactobacillus* характеризується товстим шаром пептидогліканів. Цей багат шаровий пептидоглікан має товщину від 20 до 100 нм, його іноді називають муреїновим мішком. Він відіграє ключову роль у структурній цілісності клітини та захищає її від лізису. Пептидоглікани клітинної стінки додатково з'єднанні ковалентними та нековалентними зв'язками пов'язані з тейхновими кислотами, полісахаридами та білками.

Пептидоглікан складається з повторюваних ланцюгів залишків *N*-ацетилглюкозаміну (це похідна сполука глюкози, в якій гідроксильна група при другому атомі вуглецю заміщена на аміногрупу) і *N*-ацетилмурамової кислоти (це ефір *N*-ацетилглюкозаміну та *D*-молочної кислоти) пов'язаних між собою β -1,4-гліколізними зв'язками, широко з'єднаних двома бічними ланцюгами пентапептиду. Хімічні властивості гліканових ланцюгів лише незначно відрізняються у різних бактерій, але існують значні відмінності в композиціях стовбурових пептидів, які пов'язані з карбоксильною групою *N*-ацетилмурамової кислоти[9]. Також до пептидоглікану входять діамінокислоти, найчастіше зустрічаються мезодіамінопімелінова кислота, LL діамінопімелінова кислота, лізин, орнітин. Для просторової структури пептидоглікану наявність таких амінокислот, які мають дві аміногрупи, має принципове значення. Вони забезпечують утворення двох пептидних зв'язків між пептидними угрупованнями в молекулі. А також наявні інші амінокислоти такі, як *D*- та *L*-аланін, *D*-глутамінова кислота, *L*-серин, гліцин[10].

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

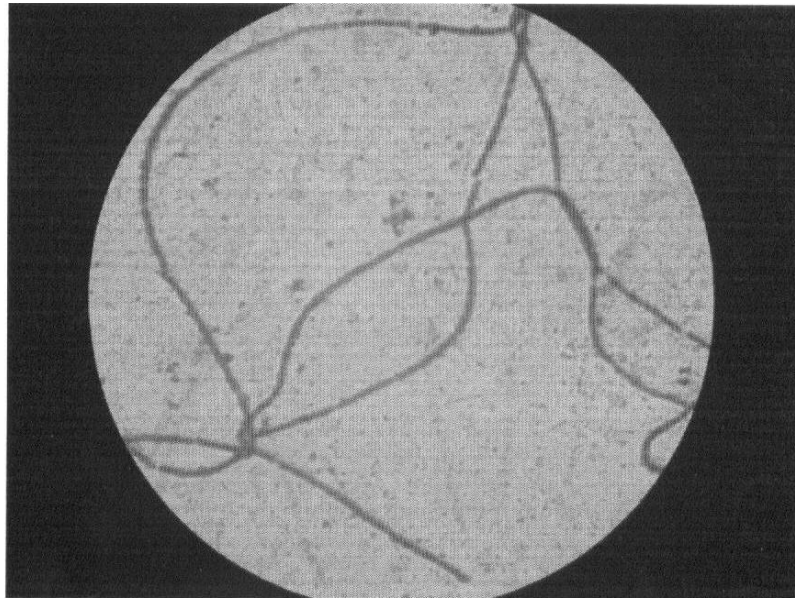


Рис. 1.1 Мікрофотографія клітин *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 [5]

1.4 Культуральні ознаки

На щільних поживних середовищах лактобактерії утворюють сферичні колонії, які часто чечевицеподібні, іноді блискучі, опуклі та з рівним, чітко окресленим краєм, гладкі та непрозорі (рис.1.2). Колонії як правило, невеликі, але у деяких видів можуть перевищувати 4 мм у діаметрі.

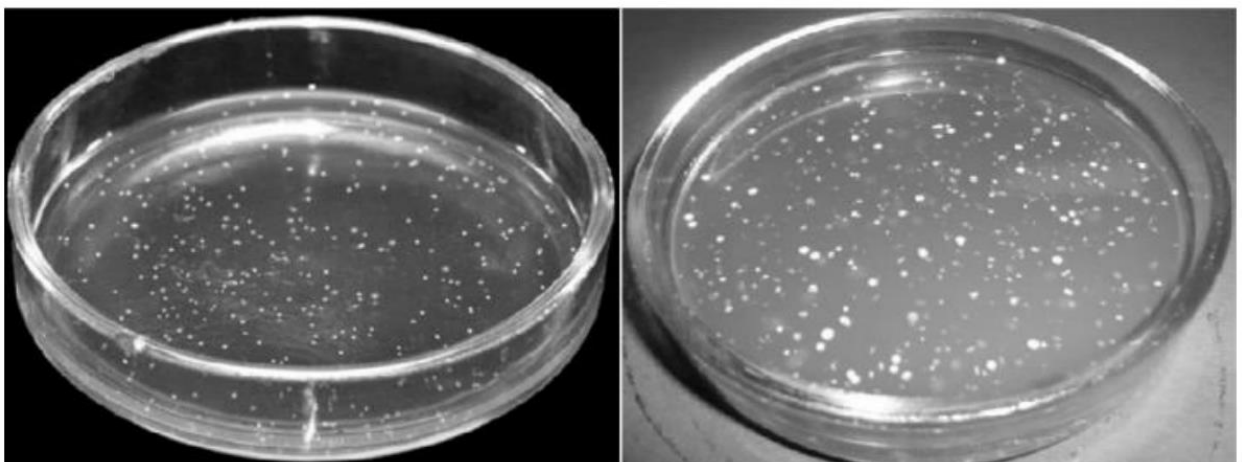


Рис. 1.2 Колонії *L. plantarum* на агаризованому середовищі MRS [11]

Зазвичай колонії не пігментовані, білого або злегка кремового кольору, іноді можуть бути жовтого або червонуватого. Деякі види утворюють шорсті колонії. На середовищах, що містять білки або ліпіди, навколо колонії зазвичай не утворюється зони просвітління. Однак більшість лактобактерій мають слабку протеолітичну активність (за рахунок протеазам і пептидаз, які секретуються і зв'язані з клітинною стінкою) і слабку ліполітичну активність (завдяки внутрішньоклітинними ліпазам). Деякі види молочнокислих бактерій (*L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. casei*) можуть продукувати позаклітинну нуклеазу при вирощуванні на агаровому середовищі, що містить ДНК або РНК [11].

При глибокому посіві на тверде середовище вони утворюють щільні колонії, які нагадують форму правильних лінз, трикутну або неправильної форми, а також можуть бути дуже ніжними, при цьому нагадувати сніжинки або грудочки вати. Якщо додати крейду в середовище, то накопичення молочної кислоти призводить до утворення зони розчинення крейди навколо колонії (рис. 1.3).

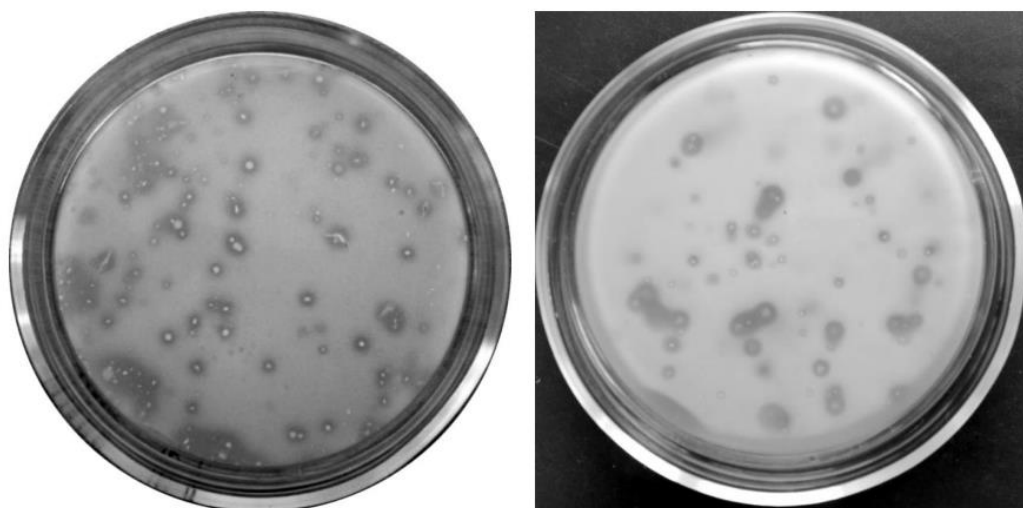


Рис. 1.3. Колонії бактерій роду *Lactobacillus* на капустяному середовищі (навколо колоній видно зони розчинення крейди, що міститься в поживному середовищі внаслідок накопичення молочної кислоти)[12]

Штам *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 росте на середовищах, селективних для молочнокислих бактерій. Якщо вирощувати на молоці 1,5% (посівна доза 1%) при температурі 37°C, заквашування молока відбувається на 8 годину культивування. При рості на щільному бульйоні МРС (Hi Media, Індія) протягом 24 годин при 42°C утворюється рівномірне помутніння та осад на дні, при цьому спостерігаються напівпрозорі бежеві колонії, які мають форму гречаного зерна в діаметрі розміром 1,0-1,5 мм. Клітини, що ростуть на щільному поживному середовищі МРС (НИЦФ, Росія) (див. Рис. 1.1) культивуються протягом 48 годин при t 37 ° С. На поверхні при цьому утворюються колонії неправильної форми, які слабо видно, бо вони напівпрозорі бежевого кольору розміром 1,0-1,5 мм в діаметрі. Мають нерівний край колонії. Поверхня також являє собою нерівну, м'якої консистенції, має слабкий блиск. Ріст по штриху слабо виражений. Штам не утворює пігментів, які дифундують в середовище[5]. Також на селективному середовищі ТРРҮРВ (ТРРҮ з берлінською лазуррю) *Lactobacillus delbrueckii* утворює маленькі білі колонії з блакитним ореолом; на селективному середовищі ТРРҮ (Tryptose Proteose Peptone yeast extract-eriochrome T agar) - пласкі, прозорі, дифузні колонії невизначеної форми з нерівною кромкою[13].

1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки

Лактобацили дуже різноманітні по своїм біохімічним і фізіологічним властивостям. Але при цьому всі мають метаболізм бродильного типу, виходячи з цього щонайменше половина вуглецю кінцевих продуктів бродіння приходить на лактат.

Lactobacillus delbrueckii ферментує глюкозу з утворенням D-молочної кислоти без вуглекислого газу, що свідчить про те, що даний

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

штам належить до гомоферментативних лактобактерій. Катаболізм глюкози відбувається по шляху Ембдена-Мейергофа-Парнаса, іншими словами гліколіз, для отримання 2 молей лактату із кожного моля глюкози. При цьому утворюється 2 молекули АТФ. Гомоферментативні молочнокислі бактерії не здатні зброджувати пентози, через те що в них є гідролітичні ферменти гліколіза (альдолази), при цьому немає фосфокетолази[14].

Всі штами *Lactobacillus* ферментують глюкозу, фруктозу, манозу і лактозу, окрім них катаболізує галактозу, сахарозу, мальтозу. Бактерії штаму *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 є хемоорганотрофами. Вони можуть ферментувати тільки лактозу. Також вони є каталазо-негативними мікроорганізмами, тобто вони не синтезують антиоксидантний фермент каталазу [15].

Lactobacillus відносяться до мікроорганізмів, які дуже вибагливі до поживних середовищ, через складні поживні потреби. Для їх активного розвитку окрім вуглеводів потрібні різноманітні фактори росту: амінокислоти, вітаміни, нуклеотиди. Рибофлавін, пантотенова та нікотинова кислоти є найбільш необхідні для більшості видів. Набір необхідних амінокислот ретельно не вивчений, але, як і більшості молочнокислих бактерій, їм необхідний аргінін, цистеїн, глютамінова кислота, лейцин, фенілаланін, триптофан, тирозин і лізин, а, можливо, ще й деякі інші. Для молочнокислих бактерій потрібні натрій, калій, фосфор, мідь, залізо, сірка, магній і особливо марганець. Цинк прискорює ріст бактерій, але пригнічує утворення молочної кислоти [16].

Так для росту лактобактерій необхідні органічні форми азоту, так як самостійно вони його не можуть синтезувати, а також вітаміни. Цим пояснюється значний вплив на їх ріст добавок до поживних середовищ різноманітних екстрактів, наприклад дріжджового або кукурудзяного. В

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

якості джерела азоту, при його дефіциті інколи можуть використовувати мінеральні сполуки азоту. Для нормального росту та розвитку *Lactobacillus delbrueckii* необхідні складні органічні форми азоту в поживному середовищі, які є джерелами пептидів так, як вони стимулюються ріст клітин більш ефективно, ніж вільні амінокислоти. Амінокислоти постачаються клітині пептидами в легкозасвоюваній формі, при цьому в захищеній формі від руйнування [17].

Для забезпечення росту культури зазвичай використовуються наступні селективні середовища: середовище Блікфельда, середовище Рогоза, середовище MPC (молочне ростове середовище). Найбільш широке розповсюдження має середовище MPC. Тому наприклад, для вирощування індивідуальних колоній штама *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 використовують 1% агар MPC-4 (Ман, Рогоза, Шарп) (НИЦФ, Росія), а для проведення аналізів, які потребують прозорі середовища для вирощування, використовують бульйон MPC (Hi Media, Індія). При цьому культивування відбувається при $37\pm 1^\circ\text{C}$ протягом 24-48 годин. Також *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 вирощується в середовищі на основі соєвого білка (1.5%) "Supro Plus 2640" (Protein Technologies International) чи в молоці з 1.5% жиру при температурі $37\pm 2^\circ\text{C}$. Для приготування середовища на основі "Supro Plus 2640" до 15 г соєвого білку додають 1 літр води та доводять рН до 7,0 та стерилізують автоклавуванням під тиском 1 атм 20 хвилин при $110-120^\circ\text{C}$. А під тиском 0.5 атм та температурі $110-120^\circ\text{C}$ стерилізують молоко 1.5% жирності автоклавуванням теж 20 хвилин [5].

На синтетичних середовищах лактобактерії не ростуть. Якщо розглянути ріст на молочному середовищі, то можна побачити, що молоко, зброджується протягом 7 годин з утворенням сирного не щільного згустку білого кольору. При цьому рН знижується до 5,5. А через 24 години культивування рН знижується до 4,5 [5].

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		20

Штам *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 під «№1071 ГУНИИЭМ», зазвичай, зберігають в стерильному знежиреному молоці при 4°C з періодичним пересівом 1 раз на 15-20 днів, або в сублімованому вигляді в запаяних ампулах з терміном зберігання більше 2 років. Штам навіть може зберігатись в замороженому вигляді при -70°C протягом 6 місяців. Але умови при висушуванні, як захисне середовище використовують сахарозу 10% при рН 7,0[5].

Можна зробити висновок, що цей штам можна використовувати в промисловості через те, що він має стабільні властивості, які не змінюються при зберіганні, в процесі культивування, а також при дії екстремальних факторів. При цьому всьому, якщо пересіювати штам не більше 20 разів на рідких та агарних середовищах, то зміна спектру стійкості до антибіотиків, антагоністична активність по відношенню до патогенних мікроорганізмів не змінюється.

По відношенню до кисню *Lactobacillus delbrueckii* належить до факультативних анаеробів, що ростуть в атмосфері вуглекислого газу, а також в присутності кисню. Лактобацили зазвичай слабо ростуть на повітрі, але краще при більш низькому вмісту кисню. Підвищена концентрація вуглекислого газу ($\approx 5\%$) може стимулювати ріст, а в чітко аеробних умовах ріст, як правило, уповільнюється. В порівнянні з іншими штамми має найвищий рівень поглинання кисню 28.6 нмоль/мг білка \times хв [8]. При цьому не редукує нітрати; не розріджує желатин.

Майже всі лактобацили - мезофіли. Температурний оптимум їх росту знаходиться в межах 30-40°C, хоча зустрічаються термофільні види, які добре ростуть і мають активний метаболізм при 45°C.

Фізіологічною особливістю лактобактерій є їх кислотостійкість. Для росту лактобацил найбільш сприятливе трохи підкислене середовище з рН

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		21

5.4-6.4, при цьому ріст вповільнюється при рН 3.6-4.0 в залежності від виду та штаму.

L. delbrueckii – мезофіли. температурний оптимум 37 ± 2 °С. *L. delbrueckii* може рости при мінімальній температурі 30°С, при значенні рН в діапазоні від 2,5 до 10,0. Оптимальним значенням рН середовища при якому відбувається ріст варіюється від 5,5 до 6,0 [5].

Лактобацили не містять в собі порфіринів, тому вони не містять каталази та цитохромів[5]. Іншою особливістю цих мікроорганізмів є стійкість до спиртів . Вони можуть розвиватись в поживних середовищах при високих концентраціях етилового спирту (18-24%).

Lactobacillus delbrueckii виявляє виражені антагоністичні властивості по відношенню до *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Lactobacillus delbrueckii розмножуються поділом материнської клітини на дві дочірніх перегородкою, в результаті до утворюються ланцюжки клітин.

1.6 Серологічні ознаки та фактори патогенності

Організація з продуктів харчування і сільського господарства Організації Об'єднаних Націй (The Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO), Управління з контролю за харчовими продуктами і лікарськими препаратами США (Food and Drug Administration - FDA) і Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) дійшли до висновку, що загалом штами, які входять до складу пробіотиків, вважаються безпечними (непатогенними) і мають GRAS статус (Generally Regarded As

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

Safe). Все це означає, що пробіотики можуть використовуватися без обмеження в харчовій і фармацевтичній промисловості.

1.7 Поширення в природі

Лактобацили мають вибагливі вимоги до росту та розвитку, тому вони займають середовища існування багаті на поживні речовини, які можна класифікувати як ферментовані або зіпсовані продукти, корми для тварин, також навколишнє середовище, включаючи поверхню рослин, ґрунт і тіло безхребетних і хребетних тварин. Лактобактерії часто трапляються у стічних водах внаслідок фекального забруднення та іноді в ґрунті, як частинка ризосфери рослин або в результаті змиву з філосфери [18]. Незважаючи на рідкісні повідомлення про виділення лактобактерій із пшениці, буряка та полуниці[19], лактобактерії є рідкісним і незначним компонентом ендосфер рослин і виявляються лише в невеликій кількості на поверхнях рослин, де сліди цукру можуть підтримувати їх ріст[20]. Їхня кількість зростає тільки після пошкодження рослинної тканини, коли прості та складні вуглеводи стають доступними субстратами[21].

Лактобацили надійно виділені з різних комах, включаючи мух і бджіл, а також з хребетних, зокрема птахів, гризунів, людей і сільськогосподарських тварин. Діапазон хазяїв, ймовірно, більший, оскільки наукові дослідження в основному обмежуються одомашненими тваринами та людьми[17]. Органи зберігання їжі, такі як передшлунок і зерно, здається, є кращим місцем існування лактобацил у тварин-господарів. Ці органи є як у комах (мух, бджіл, джмелів), так і у хребетних тварин (домашня птиця, гризуни). У людини лактобацили знаходяться в ротовій порожнині, шлунково-кишковому тракті та в піхві[22].

										ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							23

Lactobacillus delbrueckii був вперше ідентифікований у 1905 році болгарським лікарем Стаменом Григоровим шляхом виділення бактерії із зразка болгарського йогурту, яку пізніше було названо *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*[16]. Ці бактерії природним чином виявляються у шлунково-кишковому тракті ссавців, які мешкають у басейні Середнього Шоплюка на Балканах. Один із штамів *Lactobacillus delbrueckii*, а саме *Lactobacillus bulgaricus* GLB44 , витягується з листя *Galanthus nivalis* (квітка підсніжника) у Болгарії[13].

Lactobacillus delbrueckii широко розповсюджені у особливо багатих на органічні речовини середовищах, включаючи молоко та інші продукти харчування, а також вони були знайдені у клінічних зразках з мікрофлори піхви у жінок, а також мікрофлори шлунково-кишкового тракту. Зустрічаються в просвіті товстої кишки здорових людей[23]. Зазвичай знаходиться в заквасках молочних продуктів. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* відносяться до мікрофлори йогурта, яка є прикладом спеціалізованих екологічних ніш. Цей вид стабільно виділяється з мікрофлори йогурта протягом сотень років і майже не виявляється в інших джерелах[24].

Молоко, яке тільки покинуло вимя не містить лактобацил, але воно швидко потрапляють з повітря в нього або ж з інструментів і т.д. Лактобацили містяться в різних кисломолочних продуктах (сир, йогурт, кефір та інші), куди зазвичай їх додають спеціально для виготовлення цих продуктів.

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		24

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1. Характеристика кінцевого продукту

Кінцевий продукт виробництва являє собою лізат бактерій виду *Lactobacillus delbrueckii*. Лізат лактобактерій являє порошок кремового кольору, який помірно розчинний у воді для ін'єкцій та розчині хлориду натрію 0,9% для ін'єкцій, масова частка вологи складає не більше 5%. Має стабільний склад: глюкозамін не менше 15%, пептиди не менше 30%, нуклеїнові кислоти не більше 1% і біологічну активність по підсиленню фагоцитоза *in vivo* не менше 25%. Саме такий біохімічний склад гарантує спектр фармакологічних ефектів, що виникають в результаті реалізації описаних нижче властивостей препарату, що підтверджено експериментальними даними для препарату аналогу «Ліастен». За даними Інституту онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, препарати, які мають в складі бактеріальні лізати лактобацил, мають низьку токсичність, імуномодулюючі властивості (стимулюють клітинний імунітет, особливо гуморальний, малі дози, а у великих дозах можуть пригнічувати його) та мають виражену протирадіаційну дію. Препарат також має протипухлинні та антиметастатичні ефекти. Покращує мікроциркуляцію, стимулює ендотеліальну систему та прискорює регенеративні процеси[25].

Бактеріальний лізат – це продукт розщеплення бактеріальних клітин

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Томілко К.О.</i>			<i>Біохімічні основи виробництва</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Консульт.</i>						<i>Д</i>	<i>25</i>	<i>152</i>
<i>Керівник</i>		<i>Яловенко О.І.</i>				<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ</i>		
<i>Затвер.</i>								

на фрагменти, який включає фрагменти клітинної стінки і їх внутрішньоклітинного вмісту або\та суміш антигенів до різних мікроорганізмів, які найчастіше викликають запальні захворювання верхніх і нижніх дихальних шляхів, а також використовуються для лікування та профілактики бактеріальних інфекцій. Спеціальна методика лізису при виробництві бактеріальних лізатів дозволяє зберегти найважливіші непатогенні антигенні детермінанти, які розпізнаються (зчитуються) рецепторами імунокомпетентних клітин як сигнал - загроза з подальшим запуском каскаду імунних реакцій, спрямованих на захист від реальних патогенів і вже протягом тривалого часу широко використовуються для профілактики і лікування різних паталогічних станів.[26]

Розвиток фундаментальної та прикладної імунології зумовив розуміння того, що функції імунної системи можуть значно змінюватися під впливом різноманітних ендогенних та екзогенних чинників. У результаті з'явився новий клас фармакологічних засобів — імуотропні препарати — синтетичні, біотехнологічні або природні речовини, які здатні впливати на різні ланки імунної системи і завдяки цьому змінювати силу, характер і спрямованість імунних реакцій. Антибактеріальна та противірусна терапія при інфекційних захворюваннях усуває збудник з макроорганізму, відновлюючи його антигенструктурного гомеостазу. Наразі запропоновано різні класифікації імуотропних фармакологічних засобів, які розподіляють препарати:

- за характером їх впливу на імунну систему;
- за механізмом їх дії;
- за їх походженням та хімічним складом. [27]

За характером впливу розрізняють імуотропні препарати 4 великих груп: імунодепресанти, імуномодулятори, імунокоректори,

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		26

імуностимулятори (за Хаїтов та співавт.)[28]. Згідно з іншими класифікаціями, всі імуностимулятори прямої дії об'єднують у широку групу імуномодуляторів, яка включає імуностимулятори, імуносупресори та імунодепресанти [29].

Модуляція означає зміну поточного стану імунної системи в будь-якому напрямку, і залежно від характеру цієї зміни імуномодулятори можна класифікувати як стимулятори, супресори або коректори.

Отже, до імуномодуляторів належать препарати з прямою імуностимулюючою активністю, які в терапевтичних дозах змінюють функцію імунної системи. Суть імуномодулюючого феномену полягає в тому, що застосування фармакологічних засобів у певних дозах і часових режимах викликає бажані зміни в імунній системі в результаті безпосереднього впливу препарату на функціональну активність клітин імунного захисту або в результаті змін у взаємодії імунно-відповідальних клітин або їх продуктів [30].

Імуносупресивні засоби - це фармакологічні імунодепресанти, які нормалізують певні порушення імунної системи (наприклад, Т-клітинної імунної системи, В-системи, фагоцитозу, комплементу), знижуючи надмірно підвищені показники і підвищуючи знижені рівні. Це передбачає існування імуномодуляторів з певними імунокомпетентними клітинами, які впливають лише на специфічні функції, яких сьогодні майже не існує. Тому до імуностимуляторів на 100% можна віднести лише засоби, що застосовуються в імунотерапії для компенсації дефіциту специфічних речовин (антитіл, комплементу), клітинних факторів (інтерферонів, інтерлейкінів, факторів росту) або клітин (трансплантація кісткового мозку або введення лімфатичного концентрату).

Імуностимулятори - це група препаратів, які діють для стимуляції імунної відповіді. До них належать фармакологічні препарати, а також

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		27

імуномодулятори логічно розділити на екзогенні та ендогенні імуномодулятори, а потім на відповідні підгрупи за походженням (рис. 2.1) та хімічним складом [32].

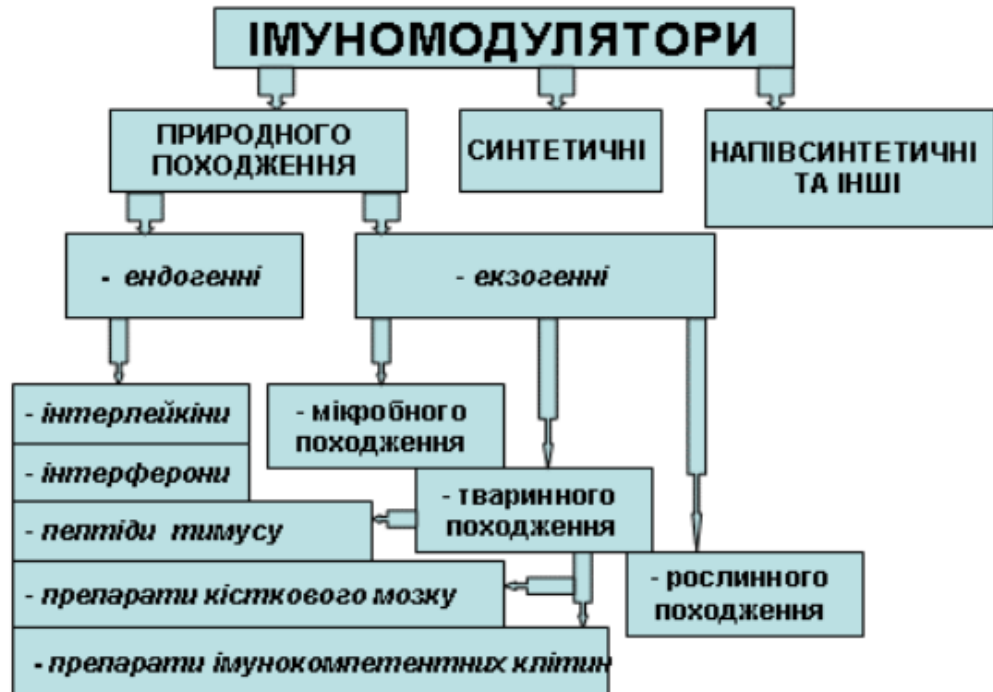


Рисунок 2.1 Класифікація імуномодуляторів за походженням [32].

За механізмом дії J.W. Hadden [33] класифікував імуномодулятори як засоби, що діють переважно на моноцити/макрофаги, Т-лімфоцити, В-лімфоцити та природні кілери (NK). В принципі, фагоцити (NK і макрофаги) є мішенню для агентів, отриманих з мікробіоти (деякі синтетичні препарати, такі як Продігіозан, Пірогенал, Рибомуніл, Лікопен, Нуклеат натрію і Поліоксидоній). Характерною особливістю цих ефектів є активація клітин моноцитарно-макрофагальної системи, NG-клітин та NK-клітин, які є природними факторами резистентності. Активація макрофагів збільшує синтез майже всіх цитокінів, що виробляються цими клітинами, і підвищує функціональну активність як клітинних, так і гуморальних факторів адаптивного імунітету. Іншими словами, під впливом цих агентів відбуваються зміни в усій імунній системі [33]. Це відповідає природному

перебігу імунної активації і спостерігається при розвитку будь-якої імунної відповіді. Традиційно такі зміни в імунній системі під впливом імуномодуляторів називають доцентровими, що означає, що їх вплив відбувається від периферії до центру; Т-лімфоцити є основними мішенями для таких тимоцитарних агентів, як тимарин, тактивін, тимоген, тимопін та імунофан [35]. Ці імуномодулятори активують проліферацію та диференціацію Т-лімфоцитів шляхом збільшення продукції інтерлейкіну 2 (ІЛ-2) та його поглинання сенсорними клітинами, а також впливають на синтез фактора некрозу пухлин (ФНП- α). Як ІЛ-2, так і ФНП- α мають багатогранний вплив на різні ланки імунної системи та змінюють функціональну активність моноцитарно-макрофагальних клітин та ін. Традиційно такі зміни в імунній системі називають відцентровими, тобто від центру до периферії [34].

2.2.Схема хімічних перетворень

В процесі біосинтезу цільового продукту біохімічні перетворення глюкози будуть здійснюватися за гомоферментативним шляхом (шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса). Під час гомоферментативного бродіння глюкоза спочатку окислюється до пірувату по гліколітичному шляху, а потім піруват відновлюється до молочної кислоти, реагуючи з коферментом НАДН₂, який синтезується під час дегідратації 3-фосфогліцеринового альдегіду в гліколізі. В результаті такого бродіння утворюється переважно молочна кислота, яка складає не менше 90% усіх продуктів. (рисунок 2.2).

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		30

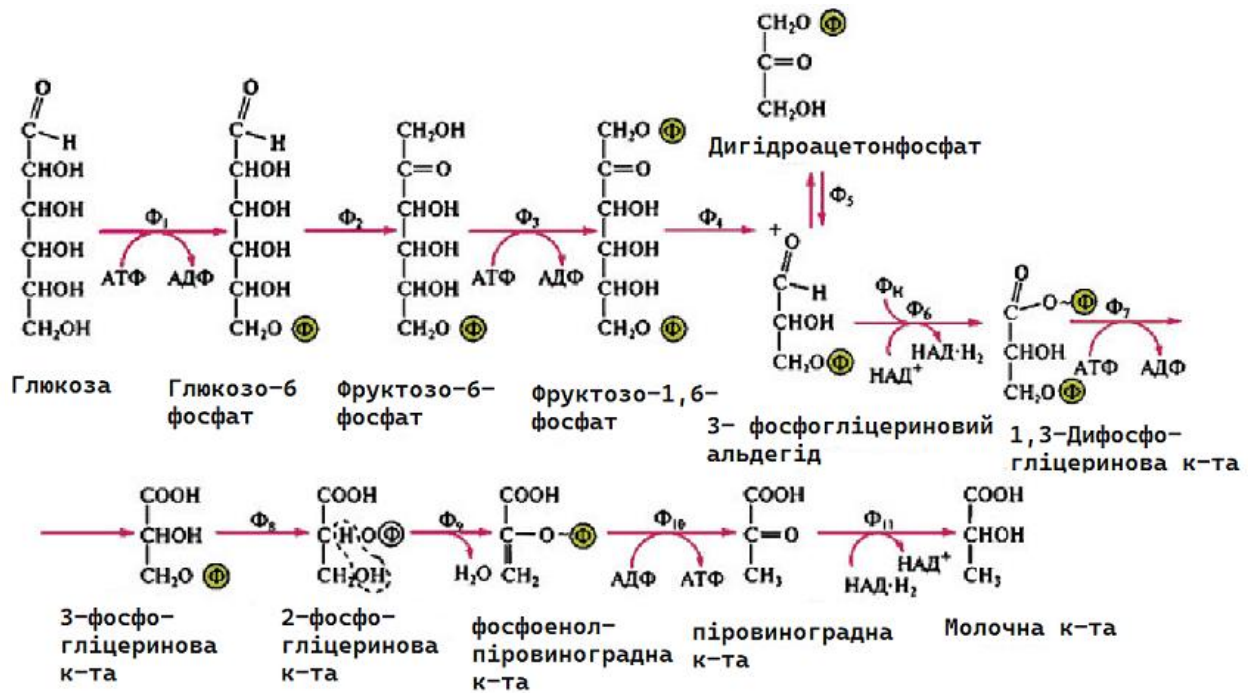


Рисунок 2.2 Гомоферментативного бродіння:

Ф1 – гексокіназа, Ф2 – глюкозофосфатізомераза, Ф3 – фосфоглюкокіназа, Ф4 – фруктозо-1,6дифосфат-альдолаза, Ф5 – тріозофосфатізомераза, Ф6 – 3-ФГА-дегідрогеназа, Ф7 – фосфогліцераткіназа, Ф8 – фосфогліцеромутаза, Ф9 – енолаза, Ф10 – піруваткіназа, Ф11 – лактатдегідрогеназа[31]

Першою реакцією цього процесу є фосфорилювання глюкози до глюкозо-6-фосфату за рахунок молекули АТФ. При цьому, АТФ у цій реакції виступає донором фосфору, а також енергії, необхідної для утворення фосфатного зв'язку в молекулі глюкозо-6-фосфату. Ця енергія звільняється внаслідок розриву макроергічного зв'язку АТФ. Каталізує цю реакцію гексокіназа (Ф1).

Далі глюкозо-6-фосфат, під впливом гексозофосфатізомерази (Ф2), ізомеризується до фруктозо-6-фосфату.

Утворений фруктозо-6-фосфат, під впливом фосфоглюкокінази (Ф3), реагує з ще однією молекулою АТФ і фосфорилюється до фруктозо-1,6-дифосфату.

Наступною реакцією є розпад дифосфогексози фруктозо-1,6-дифосфату на дві фосфотріози – дигідроацетонфосфат та 3-фосфогліцериновий альдегід. Каталізує реакцію фермент альдолаза (Ф4).

Утворені фосфотріози, під впливом тріозофосфатізомерази (Ф5), легко ізомеризуються одна в одну.

Далі 3-фосфогліцериновий альдегід перетворюється на 1,3-дифосфогліцеринову кислоту. У цій реакції бере участь складний ферментний комплекс гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа (Ф6), що складається з 4 ідентичних субодиниць, містить SH-групи і кофермент НАД. Цей фермент окиснює альдегідну групу фосфогліцеринового альдегіду до карбоксильної. Окиснення супроводжується виділенням енергії, яка затрачається на утворення макроергічного зв'язку з неорганічним фосфором, а донором електронів під час окиснення альдегідної групи виступає кофермент НАД⁺, що відновлюється до НАД•Н₂ приєднуючи водень[32].

Утворена 1,3-дифосфогліцеринова кислота дефосфорилується до 3-фосфогліцеринової кислоти з утворенням молекули АТФ. Каталізує реакцію фермент фосфогліцераткіназа (Ф7). У цій реакції відбувається перенесення фосфатного залишку від ацилфосфатної групи 1,3-дифосфогліцеринової кислоти на АДФ. Частина енергії, що виділяється під час розриву ацилфосфатного зв'язку використовується на синтез АТФ, а частина її вивільняється. Ця реакція носить назву першого субстратного фосфорилування, тому що у ній відбувається фосфорилування АТФ безпосередньо за рахунок субстрату, що перетворюється (1,3-дифосфогліцеринової кислоти).

Далі 3-фосфогліцеринова кислота під впливом ферменту фосфогліцератмутази (Ф8) перетворюється на 2-фосфогліцеринову кислоту.

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		32

Утворена 2-фосфогліцеринава кислота, під впливом енолази (Ф9), перетворюється на фосфоенолпіровиноградну кислоту. У цій реакції відбувається дегідратація 2-фосфогліцеринавої кислоти. Цей процес супроводжується перерозподілом енергії всередині молекули, внаслідок чого виникає макроергічний зв'язок[33].

Наступною реакцією є друге субстратне фосфорилування, у якій відбувається дефосфорилування фосфоенолпіровиноградної кислоти і синтез 2 молекул АТФ. У цій реакції фосфатний залишок високоенергетичного енолфосфату переноситься на АДФ з утворенням АТФ і енолпіровиноградної кислоти, яка перетворюється на піровиноградну кислоту. Каталізує реакцію фермент піруваткіназа (Ф10).

На цьому гліколітичні реакції завершуються, а утворена піровиноградна кислота, під впливом лактатдегідрогенази (Ф11) відновлюється коферментом НАДН₂, який утворився під час утворення 1,3-дифосфогліцеринавої кислоти, до молочної кислоти.

Отож, внаслідок розпаду молекули глюкози гомоферментативним типом молочнокислого бродіння, утворюється дві молекули молочної кислоти, а його енергетичний вихід становить 2 молекули АТФ[34]. Відновлений НАДН₂, що утворюється під час синтезу 1,3-дифосфогліцеринавої кислоти, є еквівалентним 3 молекулам АТФ, але для їх утворення необхідне окиснення цього коферменту у дихальному електрон-транспортному ланцюгу, що відбувається лише в аеробних умовах, а за відсутності кисню, акцептором катіонів Н⁺, донором яких виступає НАДН₂, стає піровиноградна кислота, що внаслідок їх приєднання, відновлюється до молочної кислоти[34].

Сумарно процес гомоферментативного молочнокислого бродіння можна виразити наступним рівнянням:



					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		33

До складу казеїново-дріжджового середовища для здійснення виробничого біосинтезу входить лактоза у кількості 1,0%. Лактоза - дисахарид, тому перш ніж вступити на шлях катаболізму, вона повинна бути розщеплена ферментом галактозидазою до глюкози і галактози. Глюкоза потім фосфорилується з утворенням глюкозо-6-фосфату за гомоферментативним шляхом. Найкраща бродильна активність лактобактерій спостерігається за таких параметрів культивування: рН 5,5-5,8; як правило, ростуть при 45°C і вище, зазвичай не розвиваються при 20°C і ніколи не ростуть при 15°C [9].

У 1974 р. група французьких дослідників під керівництвом E.Lederer встановила, що порівняно невелика за молекулярною вагою речовина - мурамоїл-L-лізил-D-глутамінова кислота (мурамідипептид), що є складовим компонентом пептидоглікану клітинної стінки, володіє таким же ад'ювантним ефектом, здатністю стимулювати антиінфекційну резистентність, протипухлинний імунітет, активувати імунокомпетентні клітини та індукувати синтез ряду цитокінів, як і цілі клітини мікобактерій [36].

Біологічну активність лізату забезпечує гетерополімер пептидоглікану, який отримується внаслідок змішування клітинних стінок лактобактерій після відділення рідкої фази з лізоцимом курячого білку. Цей процес відбувається при температурі 37°C протягом 5 годин, при цьому 0.1н NaCl рН доводиться до 7[36]. Глікозидні зв'язки між N-ацетилмурамовою кислотою і N-ацетилглюкозаміном розщеплює лізоцим. При дії лізоцима на суспензію клітинних стінок в концентрації 1,5 мкг лізоцима на 1см³ ланцюги муреїну розщеплюються до дисахаридів. При цьому лізоцим є N-ацетилмурамідазою[37]. Прикладом пептидоглікану клітинної стінки є рис.2.3.

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		34

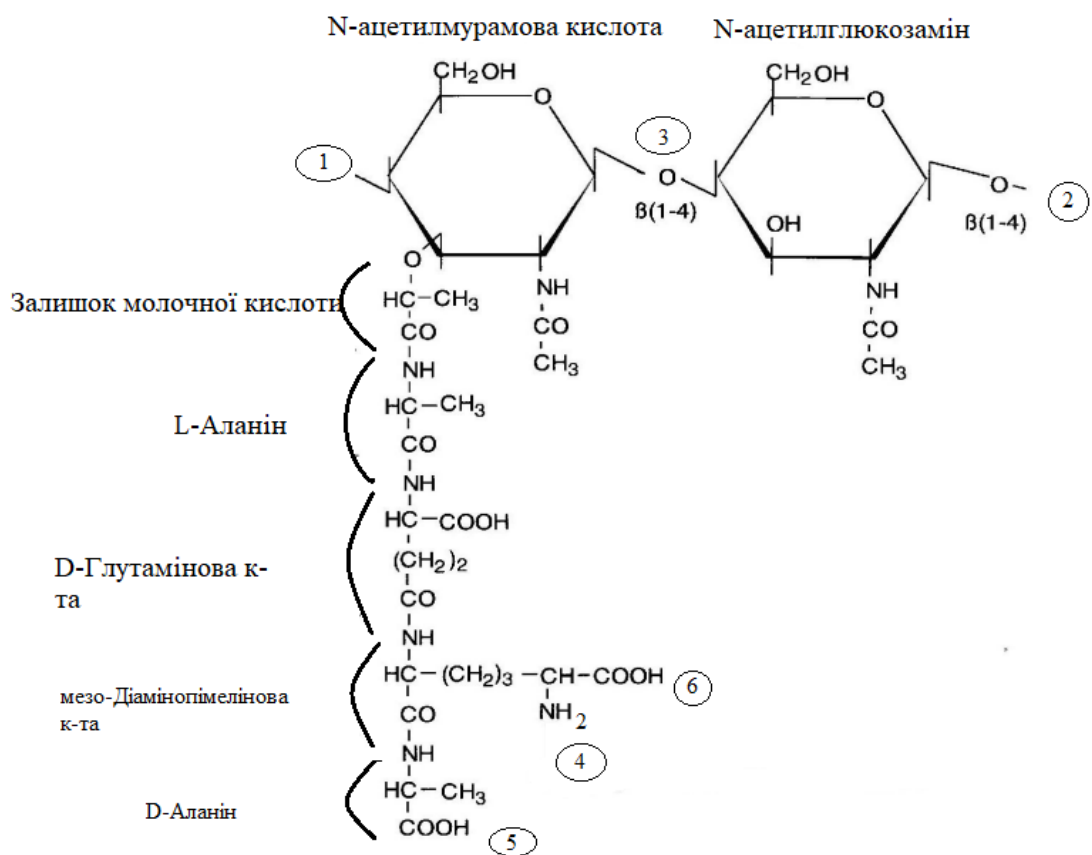


Рис. 2.3 Структура гетерополімеру пептидоглікану[36].

1,2- це місця полімеризації гліканової основи молекули; 3- місце дії лізоциму; 4, 5 - місця, за якими відбувається зв'язування між глікановими ланцюгами за допомогою пептидних зв'язків; 6 - місце ковалентного зв'язування (пептидний зв'язок) з ліпопротеїдом зовнішньої мембрани у грамнегативних еубактерій.

2.3.Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Препарат являє собою лізат *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06, діючою речовиною є **глюкозамінілмурамілпентапептид**, присутні супутні речовини такі, як продукти метаболізму, фракції цитоплазми, полісахариди, вільні амінокислоти. Також в склад входить Декстран 70

для запобігання росту бактерій та інших мікроорганізмів, як консервант. Декстран 70 утворює стабільний комплекс із лізатами, що дозволяє знизити ймовірність руйнування біологічних компонентів та зберегти їх активність. Крім того, він забезпечує захист лізатів від окислення та інших негативних факторів, які можуть посилити якість та ефективність ліків[38].

Готовий препарат має відповідати вимогам фармстатті «Імуномодулятор “бластен”»:

- зовнішній вигляд - аморфна маса білого кольору;
- прозорість розчину – прозорий;
- колір розчину – безбарвний;
- стерильність – стерильний;
- токсичність – нетоксичний;
- час розчинення – 24с;
- втрата в масі при висушуванні - 4%;
- механічні включення - в нормі (20 частинок розміром до 10мкм в 25мл);
- маса вмісту флакону – 0,020г;
- біологічна активність - посилення фагоцитозу на мишах масою від 18г до 20г - 30%[1].

2.4.Методи очистки цільового продукту

Так, як після процесу біосинтезу культуральна рідина містить в собі деякі компоненти поживного середовища, залишки метаболітів і біомаси молочнокислих бактерій, то необхідно відокремити ці залишки від культуральної рідини. Якщо цей етап пропустити, то може погіршитись якість кінцевого продукту[39].

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		36

Для очистки цільового продукту розрізняють такі методи:

1. Методи згущення (відстоювання, флотація)
2. Методи розділення твердої та рідкої фаз (фільтрування, центрифугування, сепарування)
3. Методи екстагування і концентрування
4. Мембранні методи очистки (діаліз та електродіаліз)
5. Барометричні методи очистки (мікрофільтрація, ультрафільтрація, метод зворотного осмосу)
6. Методи виділення продукту біосинтезу методом осадження (висолювання, адсорбційні методи очистки)

Процес **відстоювання** використовують для осадження часток під дією сили тяжіння (осідають і клітини і тверді частки). Особливість: частки мають бути $>3\mu\text{m}$. Метод використовують при виділенні стабільних продуктів (бо відстоювання досить тривалий процес – мінімум кілька годин). Метод досить економічний. Використовують як метод попереднього розділення культуральної рідини. Приклад – біосинтез при наявності великих клітин (дріжджі, актиноміцети). Не є методом повного розділення, а лише згущення. Метод поширений у БВК, бактеріальних добрив [40].

Флотація – дозволяє виділити тверді частки (клітини, частки поживного середовища) за допомогою повітря, що продувається через суспензію, внаслідок чого клітини і частки прикріплюючись до пухирців повітря виносяться в верхній пінний шар.

Особливості процесу – багатотонажні виробництва (десятки m^3), переважно безперервні (виробництво дріжджів). Використовують у виробництві препаратів для сільського господарства, БВК, дріжджів[41]. Переваги: можливість безперервного процесу, мала енергоємність, нетрудоємність. Флотація це скоріше не згущення, а розділення клітини за

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		37

певними параметрами (вік, розмір, навіть вид клітин). Недоліки: втрати культуральної рідини і самого продукту (6-8%).

Методи розділення твердої і рідкої фаз використовують або безпосередньо після біосинтезу або після попереднього розділення, або коли утворюються 2 фази, які необхідно розділити.

Фільтрування: процес розділення фаз при пропусканні суспензії через пористу (фільтруючу) перегородку. Зараз є різні системи фільтрувальні такі, як барабанні, стрічкові, тарілчасті фільтри, карусельні вакуум-фільтри, фільтри-преси, мембранні фільтри. Недоліки: наявність клітин на фільтрі, шар яких знижує швидкість потоку рідини в процесі фільтрування. Переваги: малі енергетичні затрати та затрати праці [42].

Сепарування: процес розділення змішаних об'ємів сумішей різної густини, емульсій, суспензій твердих часток або краплинок в газі. Сепарація можлива, коли розчин має відмінності в характеристиках компонентів суміші: розмір або форма твердих часток, їх маса, густина, коефіцієнт тертя, міцності, пружності, змочування поверхні, радіоактивності. Рушійною силою є відцентрова сила.

Ефективність розділення пропорційна швидкості обертання барабана, діаметру барабана, розміру частинок і різниці густини між твердою і рідкою фазами. Недоліком є підвищена енергоємність процесу[60].

Центрифугування: процес розділення твердої і рідкої фази під впливом відцентрової сили. Обмеження: не дуже висока густина суспензії (щоб не відбувалась залипання між тарілками), висока енергоємність, значна кількість ручної праці, складність експлуатації (ненадійність, вібрація, шум, необхідність періодичної розбирання і миття і т. п.).

Цей метод вимагає дорожчого обладнання, ніж фільтрування, через це використовується коли: а) швидкість фільтрації суспензії надто повільна; б) необхідно максимально розділити культуральне середовище і частки, які в ньому містяться; в) необхідно забезпечити безперервний процес сепарації, коли фільтри розраховані на періодичну дію[43]. У деяких біотехнологічних процесах центрифугування та фільтрація комбінуються, тобто використовуються фільтраційні центрифуги, в яких поділ рідкої та твердої фази заснований на двох процесах фільтрування та центрифугування.

Однак основні переваги центрифугування - висока продуктивність та ефективність, які дають змогу цьому методу успішно конкурувати з іншими методами розділення.

Мембранні методи очистки: діаліз та електродіаліз

Розділення речовин за допомогою діалізу ґрунтується на селективній проникності мембрани для речовин з різною молекулярною масою. Рушійна сила – різниця концентрацій (по обидві сторони мембрани).). Переваги **електродіалізу** : процес йде швидше порівняно з діалізом, більш ефективна і швидка очистка розчину, для великих об'ємів. Недоліки: розбавлення в 2-4 рази.

Тому, враховуючи все вище сказане як метод відокремлення біомаси клітин від рідини, обираємо сепарування. Потім на стадії виділення продуктів біосинтезу, тобто лізису використовується спочатку гідроліз – руйнування клітинних оболонок під дією хімічних реагентів та температур. Після чого додатково використовується ферментоліз - руйнування клітинних оболонок під дією ферментів при підвищеній температурі. Після кожної з цих стадій проводять центрифугування для відділення осаду та супернатанту.

Оскільки товарний вид препарату є ліофілізований порошок, то осад, що залишається, потрібно ретельно висушити. Процес сушіння здійснюється в розпилювальній сушарці. Розпилювальна сушка є дуже поширеним методом отримання мікробних синтетичних продуктів з природних розчинів, оскільки вона є дуже швидкою і сушка відбувається за лічені секунди.

2.5.Механізм впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Лізати близькі до вакцин, хоча механізм їх впливу на імунну систему відрізняється. Мета вакцин і лізатів аналогічні, тобто викликати відповідь імунної системи ще того початку масової атака патогена на організм людини[44]. Головна ціль імуномодуляторів мурамилпептидного ряду в організмі є фагоцитарні клітини. Під їх впливом відбувається підсилення функцій фагоцитів: підвищується інтенсивність фагоцитозу та внутрішньоклітинного кілінгу поглинутих бактерій, а також продукування допоміжних цитокінів, які необхідні для ініціації гуморального та клітинного імунітетів. Завдяки цьому посилюється продукування антитіл, активується вироблення Т-хелперів та Т-кілерів, клінінг мікроорганізмів, пухлинних та вірусінфікованих клітин відбувається за рахунок активації лізосомальних ферментів та утворення активних форм кисню. Під впливом цих препаратів може підвищуватись, також протипухлинна резистентність організму.

Імуномодулятори мурамилпептидного ряду дозволяють зменшити побічні міелосупресорні ефекти поліхіміотерапії або променевої терапії, а також досягнути імунореабілітуючого ефекту. Також зменшує частоту розвитку первинних лейко- та лімфопеній, при цьому підвищує рівень

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		40

лейкоцитів периферичної крові до моменту закінчення курсу лікування [45].

Бактеріальні лізати стимулюють специфічні та неспецифічні захисні сили організму шляхом стимуляції імунних реакцій 1-го типу (Th1), які є більш зрілими, ніж вроджені Th2-відповіді дитини. Під впливом мікробних подразників у дітей розвивається відповідь Th1 типу, яка в даний час відсутня через відносну рідкість бактеріальних інфекцій, вироблення цитокінів (інтерферон (IFN), інтерлейкін-1 (IL-1), IL-2, фактор некрозу пухлин, (ФНП-а)), які запускають реакцію Th1-типу, може бути пов'язана з відсутністю належного застосування жарознижувальних препаратів, які пригнічують пригнічення реакції Th1-типу, що перешкоджає розвитку більш стійкої відповіді на інфекцію і формуванню імунної пам'яті[45].

Бактеріальні лізати стимулюють вироблення цитокінів Th1-типу, стимулюють активність IgA, sIgA (секреторного IgA), лізоциму і природних кілерів у слизовій оболонці дихальних шляхів і нормалізують рівень клітин CD4 за рахунок зниження IgE і антитіл цього класу. Ця дія лізину зараз вважається важливим фактором, що сприяє встановленню зрілої імунної відповіді та зменшенню респіраторних захворювань [33, 34].

Досліди Бластена на мишах, який є імуномодулятором мурамилпептидного ряду показали, що високі дози (67-72 мг/кг) та низькі (0,06-0,09 мг/кг) мають різний вплив на різні частини імунної системи та різну динаміку імуномодулюючих ефектів. Низькі дози стимулюються відповідь лімфоцитів на мітогени, кооперативні реакції специфічного імунітету та неспецифічну цитотоксичність лімфоцитів, при цьому не впливають на активність моноцитів/макрофагів, в жодному із випадків[67].

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		41

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

Бактерії роду *Lactobacillus* вченими досліджуються дуже довгий час. Через це вони є одні з найбільш вивчених та досліджених груп бактерій і геном багатьох штамів розшифрований. Молочнокислі бактерії приваблюють вчених своєю багатофункціональною роллю у клінічній, сільськогосподарській та харчовій практиці[46].

Представники цього роду зазвичай мають невеликі геноми розміром 1,7-2,7 Мб і мають невеликі відхилення 1,23 Мб і 4,91 Мб. Вид *Lactobacillus delbrueckii*, який був обраний в якості продуцента, має три підвиди, тобто *subsp. delbrueckii*, *subsp. lactis* і *subsp. bulgaricus*. У різних штамів *Lb. Delbrueckii subsp. bulgaricus* було досліджено сорок вісім геномів, середня загальна довжина яких становила 1,87624 Мб і середня кількість білка 1641 і середній G + C% 49,8[47].

Частину хромосомної ДНК *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 було досліджено молекулярними методами генетики, а потім ідентифіковано та порівняно з аналогічними ділянками інших видів мікроорганізмів. Все це було зроблено для полегшення візуальної ідентифікації природного штаму *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 як представника виду *Lactobacillus delbrueckii* - *Lactobacillus delbrueckii*.

ДНК штаму *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 під «№1071

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Томілко К.О.</i>			<i>Методи отримання промислових продуцентів</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Консульт.</i>						<i>Д</i>	<i>42</i>	<i>152</i>
<i>Керівник</i>		<i>Яловенко О.І.</i>				<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ</i>		
<i>Затвер.</i>								

ГУНИИЭМ», що відповідає кодууючій ділянці рибосомного оперону (16S РНК). Методом Сенгера була секвентована ДНК вище сказаного штаму, в результаті чого було визначено нуклеотидну послідовність, яка тепер дає можливість ідентифікувати даний штам в будь-яких препаратах або продуктах, що містять цей штам.

TTCGGGTGCTTAAAATGCCAGTCGAGCGAGCTGAATTCAAAGA
TTCC

TTCGGGATGATTTGTTGGACGCTAGCGGCGGATGGGTGAGTAA
CACG

TGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGATACCACTTGGAAACAGG
TGCT

AATACCGGATAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTGAAAG
GCGG

CGTATGCTGTCACTTTAGGATGAGCCCGCGGCGCATTAGCTTG
TTGGT

GGGGTAAAGGCCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAAA

Ця послідовність при порівнюванні з базою даних нуклеотидних послідовностей Genbank, виявилась подібною до інших штамів *Lactobacillus delbrueckii* на 99%, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* - 97%, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* - 98%, *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* - 97%. Тому запропонований штам *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 може бути легко ідентифікований на основі вищезазначених характеристик лише для штамів з такою послідовністю ДНК. Ця послідовність була депонована в базі даних нуклеотидних послідовностей NCBI GenBank під номером доступу bankit1046222[46].

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		43

Штам *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 з номером доступу «№1071 ГУНИИЭМ» містить ген, що кодує синтез лактоцину В. Наявність цього гену було підтверджено полімеразною ланцюговою реакцією з використанням ДНК-праймерів для цього гену. Вважається, що наявність даного гена обумовлена антагоністичною активністю цього штаму[47].

На основі аналізу результатів досліджень ДНК культури штама *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 можна зробити такий висновок, що в геномі наявний ген, що кодує синтез бактеріоцинів. Для проведення експерименту з визначення гену, що кодує синтез найбільш поширених в лактобацил бактеріоцинів, за допомогою комп'ютерної програми «BLAST» було сконструйовано праймери для досліджуваного гену (табл. 3.1) [5].

Таблиця 3.1. Нуклеотидна послідовність праймерів для досліджуваного гену

Кодуючий ген	Нуклеотидна послідовність праймерів	
платарицин	CCACCTGTGAACTA GCAGCA	AGCTGCTGCGTAC CAAGATT
лактацин F	GAGTCTTGGCAACG GAAGAAGT	GATGCGGCTTAAC TGTTTCGATA
лактацин B	GTTAAGGACCAATT GCCAGACC	ATGTCTTCGTCAGT TTCGTGGA
лактацин S	GGAAGGGAGGTGG AACAGTATG	CAGACGCAGTTGG CAATAATTC

З використанням цих праймерів було проведено полімеразну ланцюгову реакцію (ПЦР) (30 циклів при температурі синтезу 58°C). В результаті реакцій ампліфікації та детекції її результатів за допомогою електрофорезу було встановлено, що геном штаму *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 має ген, що кодує синтез лактоцину В.

На рисунку 3 показано результати електрофорезу ГПЦР з використанням праймерів на ген лактоцину В, де цифрою 1 позначено смугу, що відповідає гену лактоцину В (250 п.н.), а цифрою 2 - маркер молекулярної маси по 100 п.н. На рисунку 3 показано, що розмір отриманого фрагмента ДНК становить прилизно приблизно 250 нуклеотидних пар, що відповідає очікуваному розміру в результаті ампліфікації фрагмента. Розмір очікуваного фрагмента був розрахований за допомогою комп'ютерної програми «BLAST» [48].

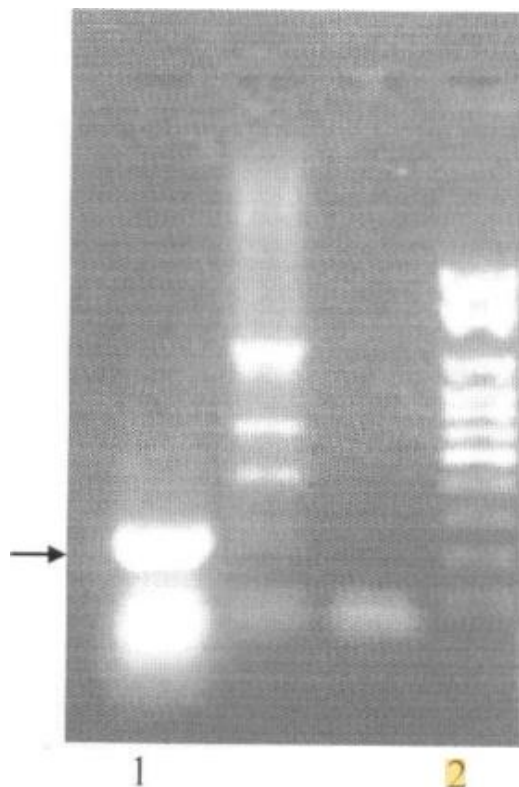


Рисунок. 3.1. Електрофорез ГПЦР з використанням праймерів на ген лактоцину В[5].

3.1.1. Наявність генетичних карт продуцентів або типового представника групи

Генетична карта типового представника групи лактобацил є *Lb. delbrueckii subsp. delbrueckii* представлена на рисунку 3.1. Геном *L. delbrueckii* TUA4408L був зібраний в одну кільцеву хромосому, що складається з 2012440 bp з 49,9% вмістом G+C (Рисунок 3.1.; Таблиця 3.1). Секвенування геному також показало, що штам TUA4408L є бактерією, вільною від плазмід. Загалом у кільцевій хромосомі штаму TUA4408L виявлено 2029 генів (1755 генів, що кодують білки), 27 рРНК (включаючи гени 5S, 16S та 23S), 95 тРНК, 3 нкРНК та 222 псевдогени.

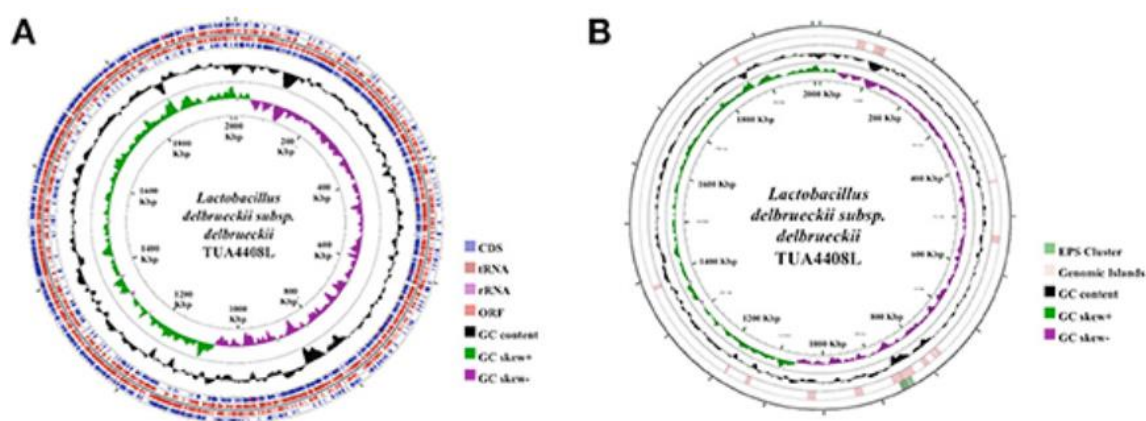


Рис. 3.2. Генетична карта *L. delbrueckii* TUA4408L[49].

Геномний аналіз штаму-продуцента екзополісахариду (EPS) *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* TUA4408L. (А) Геном був секвенований за допомогою платформи секвенування PacBio, зібраної з HGAP 3.0, і анотованого за допомогою каналу анотації прокариотичного геному NCBI. Кругова карта генома штаму TUA4408 була створена за допомогою сервера CGView. Проект секвенування геному було збережено в GenBank під номером доступу CP021136. (В)

Таблиця 3.1 Порівняння загальних особливостей геному секвенованих *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* [49].

Атрибути	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i> TU A4408L	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i> KCTC 13731	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i> DSM 20074	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i> ACC 13439	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i> NBRC 3202
GenBank доступ	CP021136	CP018216	CP018615	LHPL0000000 0	BEWJ0000000 0
Розмір геному	2012440	1910506	1953716	1766190	1787093
Вміст гДНК GC(%)	49,9	50	49,6	50,1	50,3
Рівень	Повний геном	Повний геном	Повний геном	Не повідомляється	Не повідомляється
Плазміда	Не повідомляється	Не повідомляється	Не повідомляється	Не повідомляється	Не повідомляється
Гени рНК (5S, 16S, 23S)	27 (9,9,9)	24 (8,8,8)	27 (9,9,9)	4 (0,3,1)	3 (1,1,1)
Гени тРНК	95	84	95	65	50

Інші гени НКР НК	3	3	3	Не повідомляється	3
Білки	1,744	1,617	1,587	1,521	1,599
Передбачені гени	2,029	1,921	1,984	1,804	1,816
Псевдогени	149	193	272	214	161
Масиви CRISPR	1	1	Не повідомляється	Не повідомляється	1

За допомогою інструменту пошуку RNage (RNASST) було передбачено, що геном *L. delbrueckii* TUA4408L має дві неповні профагові області, розташовані в положеннях 136643–147495 (10,8 Kbp) і 474436–498733 (24,2 Kbp). Крім того, геномні острівці були виявлені в різних блоках геному TUA4408L. Аналіз *in silico* розподілу, наявності та типу генів бактеріоцину оцінювали в *L. delbrueckii* TUA4408L за допомогою програмного забезпечення BAGEL4 та алгоритму BLASTx. Аналіз послідовності генома штаму TUA4408L виявив наявність двох ORF, що кодуєть ентеролізін А, бактеріоцин, що руйнує клітинну стінку, широко поширений серед штамів *Enterococcus*[50,51]. Цей ген також виявлено серед геномів *L. delbrueckii* з високим відсотком ідентичності (дані не показані). Гени стійкості до антибіотиків не були знайдені в штамі TUA4408L за допомогою ARDB і CARD. Геном *L. delbrueckii* TUA4408L містить локуси CRISPR і білки Cas, які забезпечують специфічний для послідовності захист від чужорідної ДНК[52]. У геномі TUA4408L ми

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		48

знайшли систему CRISPR–Cas типу IC, що складається з cas3, cas5, cas8с, cas7, cas4, cas1, cas2 і масиву CRISPR з 33 короткими прямими повторами та 18 спейсерами.

Аналіз RAST показав, що *L. delbrueckii* TUA4408L має чудовий потенціал метаболізму цукрів, оскільки його геном містить декілька генів, пов'язаних із використанням хітину, N-ацетилглюкозаміну, сахарози, мальтози, мальтодекстрину, маніту та D-рибози. Крім того, в геномі виявлено гени поглинання та утилізації трегалози, лактози і галактози, а також біосинтезу трегалози.

Було порівняно геном штаму TUA4408L з доступними геномами інших *L. delbrueckii subsp. delbrueckii*, включаючи DSM 20074, NBRC 2302, КСТС 13731 і КАСС 13439. Філогенетичне дерево, побудоване на основі мультилокусного типування послідовностей (MLST), показало, що *L. delbrueckii* TUA4408L групується окремо від інших секвенованих штамів. Щоб краще зрозуміти особливості *L. delbrueckii* TUA4408L, ми провели аналіз пангенома з геномом TUA4408L і чотирма згаданими раніше геномами. Ми виявили, що 1284 гени належать до корегеному, розрізаного п'ятьма оціненими штамми, тоді як 1573 гени належать до додаткового пангеному. Для штамів NBR 2303 (15 генів) і КАСС 13439 (72 гени) було виявлено відносно низьку кількість унікальних генів, ймовірно через те, що вони не повністю секвеновані. Штами *L. delbrueckii* КССТ 13731 і DSM 20074 мали 107 і 200 унікальних генів відповідно. Цікаво, що *L. delbrueckii* TUA4408L мав 338 унікальних генів, включаючи 136 білків з відомими функціями та 202 гіпотетичних білка.

Серед унікальних генів, присутніх у геномі *L. delbrueckii* TUA4408L, ми знайшли глікозилтрансферази, які беруть участь у біосинтезі EPS (обговорюється нижче). Крім того, кілька генів, які беруть участь у метаболізмі цукру, були знайдені в штамі TUA4408L, але не в іншому *L.*

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		49

delbrueckii subsp. delbrueckii проаналізовано. Фосфоенолпіруват-залежна цукрофосфотрансферазна система (PTS), основна система активного транспорту вуглеводів, каталізує фосфорилування вхідних цукрових субстратів, що супроводжується їх транслокацією через клітинну мембрану. У групі унікальних генів штаму TUA4408L було знайдено кілька генів PTS, включаючи ті, що беруть участь у транспорті глюкози (*ctr3*), лактоза (*lacF*), маноза (*manX*, *manZ*), олігоглюкоманнани, такі як целобіоза (*celA*, *celD*, *bglK*) і маннобіоза (*gmuC*), ліхенан (*licA*, *licC*), мальтоза (*malP*), хітиновий дисахарид N,N' -діацетилхітобіоза (*chbB*) і L-сорбоза (*sorA*, *sorB*). Транспортери трегалози (*sugC*), рибози (*rbsB*) і L-арабінози (*araQ*), генів, які беруть участь в утилізації різних цукрів, включаючи *bglA* , який відіграє важливу роль в утилізації арбутину або саліцину, і *levS* , який бере участь у метаболізмі крохмалю та сахарози, а також гени, що беруть участь у біосинтезі глікогену (*glgA*, *glgB*, *glgC* та *glgD*), галактофуранозних глікокон'югатів (*glf*) та сахарози (*inuJ*) також були знайдені в групі унікальних генів TUA4408L[47].

Також серед *L. delbrueckii subsp. delbrueckii*, що здатні рости на мелясі найвідоміший модельний штам *L. delbrueckii* NCIMB 8130, генетична карта якого представлена на рисунку 3.4.

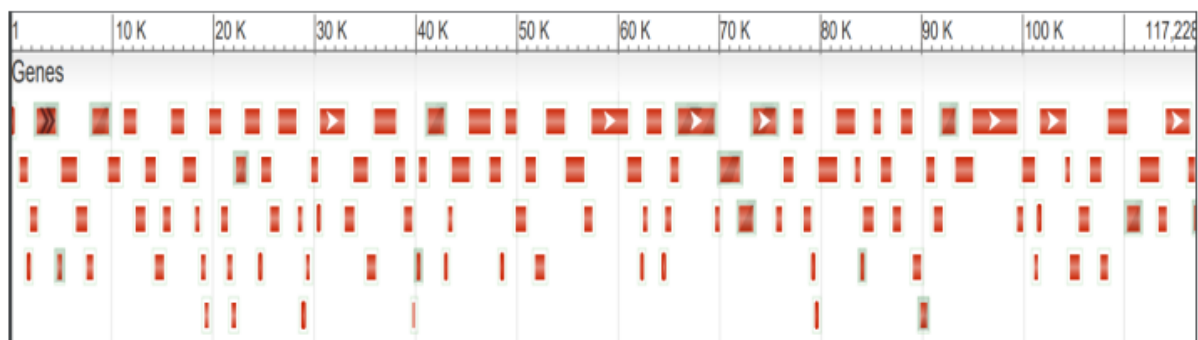


Рис.3.4. – генетична карта *L. delbrueckii* NCIMB 8130[52]

3.1.2. Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу

Молочнокислі бактерії і біфідобактерії є грампозитивними бактеріями з низьким і високим вмістом GC, відповідно, з малими геномами розміром від 1,8 до 3,3 Мб. Для тих видів, де повні геноми опубліковані та анотовані, виникає широка картина збережених і різноманітних біосинтетичних і метаболічних можливостей.

Експресія генів для *Lactobacillus delbrueckii* вивчена слабо. Але нещодавній транскрипційний аналіз глобальної експресії генів *L. Acidophilus*, вирощених на восьми різних вуглеводах показав, що гени гліколітичного шляху є одними з найбільш високо експресованих генів у геномі (рис.3.5). Оскільки лактобактерії відновлюють первинну енергію шляхом гліколізу, то ця функція ймовірно є універсальною. Аналіз геному показав, що лактобактерії, біфідобактерії, стрептококи та лактококи мають широкий діапазон сахаролітичного потенціалу, що відображає різноманітність поживних речовин, наданих різними середовищами, в яких вони живуть. Аналіз геному *L. plantarum* виявив низку транспортерів, зокрема транспортерів фосфотрансферазної системи (PTS), що корелює з широкою здатністю організму метаболізувати різноманітні вуглеводи з різних середовищ [53].

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

В основному природні штами мікроорганізмів мають низьку продуктивність. Тому в мікробіологічній промисловості використовуються такі селекційні методи, як індукований мутагенез, штучний добір, методи генної та клітинної інженерії.

Штами мікроорганізмів, що використовуються у виробництві, повинні відповідати певним промисловим стандартам, а саме:

- володіти відповідними технологічними характеристиками:
 - високою продуктивністю,
 - високою швидкістю росту (коефіцієнтом виходу біомаси),
 - температурною стійкістю,
 - кислотної стійкістю;
- фагостійкістю;
- генетичною стабільністю;
- рости на рентабельних (дешевих і доступних) субстратах;
- продукти мікробіологічного синтезу повинні бути екологічно безпечні для людини і навколишнього середовища.

Для виробництва промислових продуцентів клітини виділяють з природних субстратів, експериментально підвищують активність культури, отримують корисні форми методом гібридизації та відбирають нові форми після впливу мутагенів[55].

Природні штами мікроорганізмів не здатні продукувати в середовище таку кількість метаболіту, якого було б достатньо для його промислового виробництва. Метаболізм клітини схильний до суворої і

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		53

чіткої регуляції, і тому для використання штаму мікроорганізму в якості промислового продуцента ця регуляція повинна бути змінена таким чином, щоб використовувати біосинтетичний апарат клітини для отримання максимальної кількості необхідного метаболіту. Для цих цілей застосовують селекційні методи, такі як індукований мутагенез та штучний добір[56].

За своєю природою мутагени підрозділяються на фізичні, хімічні та біологічні. Вибір мутагену визначається:

- 1) типом мутації, яку необхідно отримати;
- 2) ефективністю мутагену щодо даного мікроорганізму.

Використання мутагенів і цілеспрямованої селекції дозволяє підвищити продуктивність штамів у сотні і тисячі разів.

Найважливішою характеристикою отриманих мутантів є їх стійкість. Деякі мутанти здатні ревертувати, причому з високою частотою, що потрібно враховувати при конструюванні штаму продуцента.

При виборі продуценту біологічно активних речовин для промислового культивування, звертають увагу на такі характеристики культури, як висока продуктивність, стійкість до впливу зовнішнього середовища, стабільність фізіолого-біохімічних ознак в умовах промислового культивування, збереження ознак при зберіганні у вигляді музейної культури [57].

3.2.1. Використання природного та штучного добору

Відбір 2-3 штамів мікроорганізмів з найвищою здатністю синтезувати речовини, що нас цікавлять, з великої кількості перспективних виробничих штамів-продуцентів різними скринінговими методами є особливістю природного та штучного добору без використання фізичних мутагенів та мутагенно-активних хімічних речовин. Якщо в результаті цього дослідника і промисловість задовільняють показники біосинтезу кінцевого продукту, то найефективніших з відібраних штамів запускають у виробництво[58].

Завдяки природному відбору генетичні ознаки, які сприяють виживанню, стають більш поширеними в наступних поколіннях популяції, тоді як несприятливі генетичні ознаки поступово зникають. Це відбувається завдяки тому, що мінливість забезпечується відмінностями між послідовностями алельних генів, а спадковість генетичним апаратом. Дослідник намагається отримати форму мікроорганізму, яка є більш адаптивною до певного несприятливого середовища, ніж вихідний мікроорганізм. Перевагою цього методу є те, що все відбувається природнім шляхом і мікроорганізм перебуває у своєму природному середовищі, а також він відносно дешевий. Недоліком є те, що це тривалий процес і в ньому використовуються неконтрольовані спонтанні мутації[59].

В подібній селекції лактобактерій використовуються хімічні та природні мутагени для отримання більш ефективних штамів з подальшою селекційною роботою з цими штамми. Перевагою цього методу є те, що отримані виробничі штами є значно ефективнішими, але недоліком є те, що відомі лише мутагени, які безпосередньо індукують випадкові мутації, що ускладнює прогнозування результату.

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		55

Також широко використовується штучний добір. Це метод селекції, при якому селекціонери створюються штучні умови існування. Мікроорганізми, які виживаються потім відбираються. Початковий штам пересівають на 100 колоній, і кожну колонію тестують на рівень синтезу. Якщо кожна колонія не відрізняється від усередненої колонії, то колонія є генетично однорідною і штучний добір проводиться без мутагенних агентів[60].

3.2.2. Використання індукованого мутагенезу

В природі дуже рідко зустрічаються лактобактерії з властивостями, необхідними для промисловості. Для того, щоб використовувати такі молочнокислі бактерії, існуючі біохімічні процеси повинні бути посилені шляхом впливу на них сильних мутагенних агентів. Селекція лактобактерій за допомогою мутагенних агентів складається з двох основних етапів. А саме, безпосередня дія потужного мутагену на організм з подальшим відбором високоактивних мутантів. Цей метод є високоефективним і практично використовується в промисловості[62].

Індукований мутагенез здійснюється шляхом впливу на організм фізичних, хімічних факторів або їх суміші[62]. Серед фізичних мутагенів, що використовуються при селекції промислових штамів молочнокислих бактерій, найчастіше застосовують ультрафіолетове випромінювання з довжиною хвилі 2650 нм, оскільки вони вибірково поглинаються молекулами ДНК і мають сприятливий мутагенний ефект, як і радіаційні мутагени (гамма-промені та швидкі нейтрони).

Хімічні мутагени мають більш тонкий і специфічний вплив на культури бактерій і є набагато ефективнішими з точки зору кількості

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		56

мутацій, ніж фізичні мутагени[63]. Порівняно з фізичними агентами, хімічні фактори є менш летальними і можуть викликати більш корисні мутації. Найпоширенішими хімічними мутагенами є формальдегід, етиленімін, оксид етилену, диметилсульфіт, нітрозосполуки тощо.

Для отримання мутантів різних штамів молочнокислих бактерій використовують комбінацію фізичних і хімічних агентів, таких як азотисті сполуки, етиленімін, ультрафіолетове світло і рентгенівські промені[64].

Метод отримання промислових штамів за допомогою індукованого мутагенезу складається з наступних етапів:

- відбір та виділення вихідних штамів для селекції;
- підготовка вихідних штамів до селекційної роботи (очищення та стабілізація культур)
- обробка штамів мутагенними факторами;
- відбір отриманих мутантів[65].

Використання індукованого мутагенезу не є необхідним для отримання більш продуктивного штаму *Lactobacillus delbrueckii*.

3.2.3. Використання методів генної та клітинної інженерії

У порівнянні з іншими класичними об'єктами (*B.subtilis*, *E.coli*, *S.cerevisiae*), *Lactobacillus* бракує генетичної вивченості і відсутні відповідні вектори для клонування, що перешкоджає їх використанню як об'єктів генної та клітинної інженерії.

Методи генетичної та клітинної інженерії не використовуються для створення економічно конкурентоспроможних продуцентів молочної

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		57

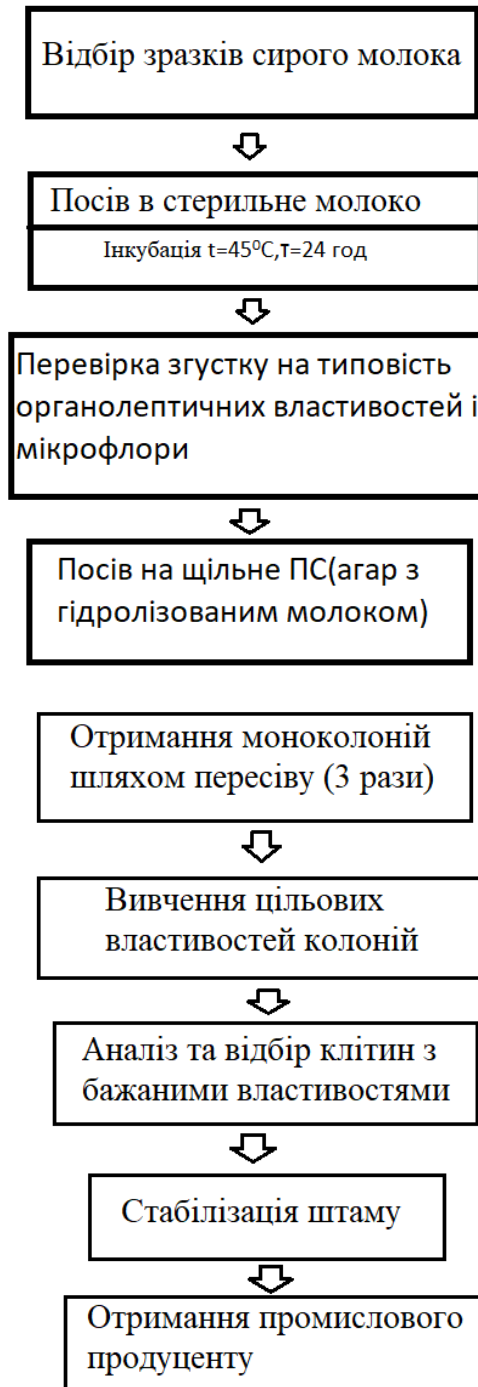
кислоти, за винятком *L. lactis*. Це значною мірою пов'язано з відсутністю розроблених інструментів для редагування геному промислово важливих штамів. Наприклад, для більшості молочнокислих штамів не має широко використовуваних високопродуктивних генетичних інструментів[66].

3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Штам *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 був виділений з кисломолочної закваски, використовуваної для отримання кислого молока. Штам *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 був отриманий шляхом багаторазового пересіву окремих колоній лактобактерій на концентроване поживне середовище з подальшим визначенням антагоністичної активності, антибіотикорезистентності та молекулярно-генетичних характеристик кожного клону. Один клон був ідентифікований як *Lactobacillus delbrueckii*, штам TS1-06.

Отриманий штам *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 зберігається в колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології біологічного факультету Московського Державного Університету ім. М.В. Ломоносова під реєстраційним номером 497 КМ МГУ. Штам використовують для виготовлення бактеріальних препаратів і виробництва рідкої молочнокислої закваски в якості продукту харчування лікувально-профілактичного призначення. Це забезпечує високу швидкість росту, широкий спектр антагоністичної активності по відношенню до грампозитивних і грамнегативних патогенних бактерій, вміст жовчі, стійкість до антибіотиків, продукування антибіотикоподібних речовин (бактеріоцинів)[5].

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		58



Блок-схема отримання продукту:

Отже, отримання високопродуктивного штаму *L. delbrueckii* на основі штучного добору полягає в наступній послідовності:

1. Для виділення культури молочнокислих бактерій відбір зразків сирого молока.

2. Підготовка штаму до селекційного етапу, посів в стерильне молоко та інкубація до згортання молока при $t=45^{\circ}\text{C}$, протягом 24 год.

3. Перевірка отриманого згустку на типовість органолептичних властивостей такі, як і мікрофлору. Згусток має бути однорідним, достатньо щільним, без виділення сироватки і мати приємний кислуватий запах та смак.

4. Для отримання окремих колоній у концентрованих середовищах проводять серійні розведення (стерильною водопровідною водою або фізіологічним розчином), щоб ізольовані колонії росли при пересіві в середовище. Суть методу розведень ілюструє рис.3.6. Посів на щільне поживне середовище - агар з гідролізованим молоком. Його готують наступним чином. Натуральне або відновлене знежирене молоко кип'ятять протягом 20 хвилин або нагрівають під текучою парою і охолоджують до $(45 \pm 2)^{\circ}\text{C}$. Додають водний розчин з масовою часткою NaOH 40 % для доведення активної кислотності до pH $(7,7 \pm 0,1)$. На 1000 cm^3 молока додають 0,5-1,0 г порошку панкреатину. Потім до молока додають 5-6 cm^3 хлороформу. Колбу закривають корковою пробкою і витримують при температурі $(40 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ протягом 18-24 годин. Протягом перших 3-5 годин молоко перемішують 2-3 рази (після перемішування кришку відкривають, щоб видалити хлороформ). Потім гідролізоване молоко фільтрують через паперовий фільтр, розбавляють дистильованою водою у співвідношенні 1:1, доводять pH активної кислотності до $7,1 \pm 0,1$ додаванням 40 % розчину NaOH на основі масової частки і використовують для приготування агару з гідролізованим молоком. Для зберігання гідролізоване молоко стерилізували в автоклаві за температури $(121 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ протягом 15 хвилин.

Для приготування агару з гідролізованим молоком використовують 1000 cm^3 гідролізованого молока і 15 г агару. Ці два компоненти змішують, середовище нагрівають до повного розчинення агару, фільтрують через

										Арк.
										60
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДП 6218. 00.000 ПЗ					

вату та розливають у пробірки або колби і стерилізують в автоклаві за наступних умов: $121 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 10 ± 1 хвилин[75].

Висів культури на щільні поживні середовища з пробірки з розведеннями можна зробити двома способами:

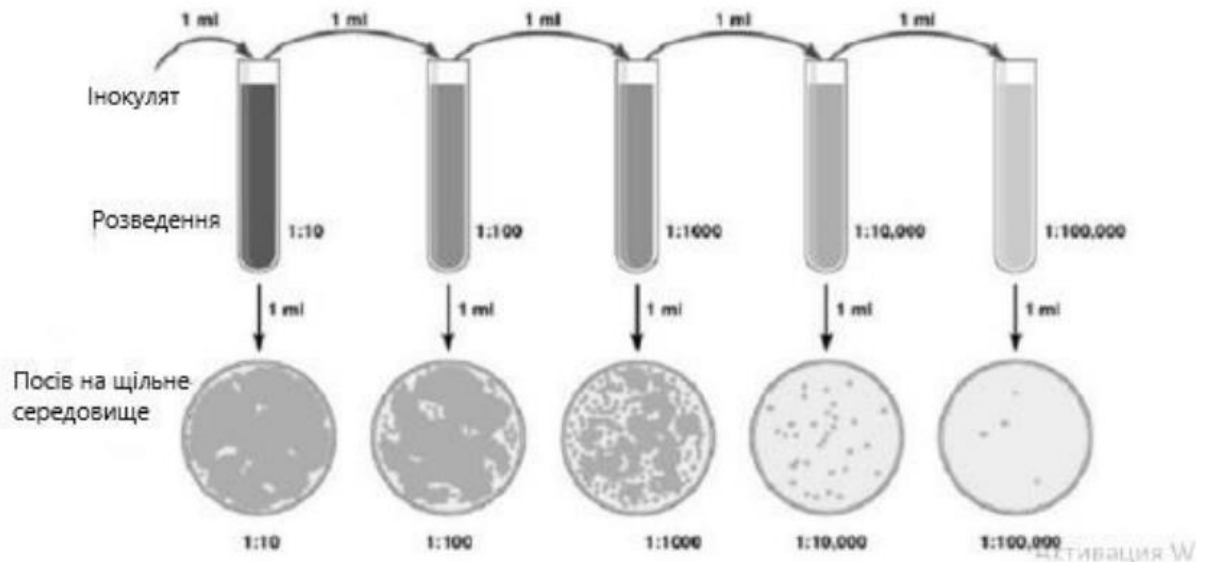


Рисунок 3.6. Метод розведень[36].

а) Методом поверхневого посіву (рис. 3.7): у стерильну чашку Петрі налити достатню кількість (15-20 мл) розплавленого та охолодженого до $45-50^\circ\text{C}$ щільного поживного середовища, щоб покрити все дно чашки. Залишити чашку в горизонтальному положенні до повного застигання середовища. Для посіву відкрити кришку чашки Петрі і нанесіть піпеткою 100 мкл живильного середовища на поверхню твердого середовища. Швидко розподілити краплю по всій поверхні середовища за допомогою стерильного скляного шпателя Дригальського.

(б) Метод глибинного культивування (рис. 3.7): Цей метод найкраще підходить для штаму *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 (оскільки він є факультативним анаеробом). У стерильну чашку Петрі за допомогою піпетки/дозатора потрібно налити 1 мл рідкого поживного середовища, додайте 15-20 мл концентрованого поживного середовища, яке було

розтоплене і охолоджене до 45 °С, обережно потрібно перемішати і залишити на горизонтальній поверхні до застигання середовища.



Рисунок 3.7. Метод глибинного та поверхневого посіву[36].

5. Отримання моноколоній шляхом пересіву, а саме три рази.
6. Вивчення цільових властивостей колоній.
7. Аналіз та відбір клітин з бажаними властивостями. Після отримання моноколоній аналізується кожна клітина окремо.
8. Стабілізація штаму: посів відібраних клонів, оцінка колоній за морфологією та продукуванням біомаси, створення варіаційних рядів та розрахунок статистичних показників (середнє арифметичне, стандартне відхилення, коефіцієнт варіації) для отриманих колоній, повторна оцінка

клонів з підвищеною продуктивністю, відбір найбільш продуктивнішого субклубу, посів та оцінка, порівняння двох варіаційних рядів та відбір найбільш продуктивного субклубу[1].

9. Отримання промислового продукту.

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		63

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

Кінцевим продуктом виробництва є лізат бактерій виду *Lactobacillus delbrueckii*.

Призначення продукції та можливі галузі використання. Лізат лактобактерій має широкий спектр дії і його призначають як імуномодулятор. Він використовується в лікуванні різних видів захворювань, що супроводжуються вторинним імунодефіцитом, лейкопенією, особливо під час хіміо- та променевої терапії у онкохворих, а також для зменшення токсичної дії цитостатиків при лейкозах. При гострих і хронічних променевих ураженнях, хірургічних операціях онкохворих. Також призначений для невідкладного лікування пацієнтів з гострими та хронічними бактеріальними і вірусними інфекціями, в тому числі туберкульозом, також застосовується в лікуванні пацієнтів з лейкопеніями різного походження.

За зовнішнім виглядом це порошок кремового кольору, помірно розчинний у воді для ін'єкцій та 0,9% розчині натрію хлориду для ін'єкцій з утворенням безбарвного прозорого розчину, з масовою часткою води не більше 5%. Майже не розчинний у спирті, ефірі та хлороформі. Діюча речовина – глюкозамінілмурамілпентапептид (0,002 г в перерахунку на пептиди), допоміжна речовина – декстран 70.

Торгова форма продукту має вигляд порошку для приготування суспензії для ін'єкцій у флаконі. Середній вміст флакону має масу 0,020г (0,002 г глюкозамінілмурамілпентапептид + 0,018 г декстран 70).

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Тамілко К.О.</i>			<i>Технологічна частина</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Консульт.</i>						<i>Д</i>	<i>64</i>	<i>152</i>
<i>Керівник</i>		<i>Яловенко О.І.</i>				<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського</i>		
<i>Затвер.</i>						<i>ФБТ</i>		

Пакування. Порошок для приготування розчину для ін'єкцій пакується у скляних флаконах типу ФЛП-5-А за ТУ 00480945-006-98 зі скла марки УСП-1 за ТУ 00480945-002-96, або у флакони типу ФИ-1-5 зі скла марки НС-3 за ТУ 9461-010-00480514—99. Пробки мають відповідати ТУ У 25.1-00152253.037- 2004, а алюмінієві ковпачки типу К-2-20 або К-2-14 – ТУ У 25206109.001- 2001. Пачки, які мають відповідати вимогам ОСТ 64- 071-89, пакують по 3 або 5 флаконів препарату у блістері за ТУ 2297-001-84410832-2013 та інструкцію з його використання.. Вони виготовляється з картону коробкового за ГОСТ 7933-89[68].

Маркування. На флакон фарбою глибокого друку для скляного посуду згідно ТУ У 42.34.011-97 наносять наступну інформацію українською мовою: назва препарату, кількість доз, номер серії та термін придатності.

Етикетки на флаконах мають інформацію українською мовою:

- виробник,
- торгова марка,
- назва препарату латиницею,
- кількість доз,
- номер серії
- термін придатності.

Етикетки українською мовою наносять на пачках і групових контейнерах:

- "Україна",
- виробник,
- торгова марка та адреса,
- назва препарату латинською, українською мовами,
- лікарська форма,

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		65

- кількість доз,
- кількість флаконів,
- "для перорального застосування",
- умови зберігання,
- "зберігати в недоступному для дітей місці",
- номер серії,
- номер реєстраційного посвідчення,
- термін придатності,
- штрих-код,
- реєстраційний номер країни імпорту (за наявності).

Номер серії та термін придатності можуть бути нанесені на бічній стороні упаковки. Додаткове зазначення кількості пачок на етикетці групової упаковки; транспортний ярлик згідно з ГОСТ 14192-96. [69].

Транспортування. Препарат лізату лактобактерій транспортують у закритих транспортних засобах за температури не вище 25 °С відповідно до ГОСТ 17768-90 та СТ-Н МОЗУ 42- 5.1:2011 “Лікарські засоби. Належна практика зберігання”.

Умови зберігання. Зберігати при температурі не вище 25 °С. Розчин препарату зберігати не більше 24 годин в холодильнику при температурі від + 4 до + 6 °С.

Термін придатності. 3 роки.

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Таблиця 4.1. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина:			
1.1 Рибний гідролізат	ДСТУ 7972:2015	Усі показники згідно НТД	Компонент ПС для отримання посівного матеріалу
1.2 Дріжджовий екстракт	ТУ 9385-007-39484474-2003	Усі показники згідно НТД	Компонент ПС для отримання посівного матеріалу та виробничого культивування
1.3 Глюкоза	ГОСТ 975-88	Усі показники відповідно до вимог ГОСТ	Компонент ПС для отримання посівного матеріалу
1.4 Магній сульфат 7-водний (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	ГОСТ 4523-77	Масова частка MgSO ₄ ·7H ₂ O не менше 99,5%	Компонент ПС для отримання посівного

борошна соєвого			культивування
1.12 Декстран 70	ГОСТ 30333-2007	Усі показники відповідно до вимог ГОСТ	Компонент готової лікарської форми
1.13 Лізоцим	ГОСТ Р 57475-2017	Усі показники відповідно до вимог ГОСТ	Для лізису клітин
1.14 Екстракт кукурудзяний	ДСТУ 2778:94	Усі показники згідно НТД	Компонент ПС для виробничого культивування
1.15 Вода дистильована	ГОСТ 6709-72	Усі показники згідно НТД	Для приготування поживного середовища
1.16 Хлорид натрію	ГОСТ 4233-77	Масова частка NaCl не менше 99,9%	Компонент фізіологічного розчину для одержання культури I генерації
1.17 Штам <i>Lactobacillus delbrueckii</i> TS1-06	Морфологія, характерна для даного продуценту, без присутності сторонньої мікрофлори		Посівний матеріал
1.18 Хлороформ	ГОСТ 20015-88	Усі показники відповідно до	Для виключення бактеріального

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		69

активоване		кольору без механічних домішок та інші вимоги згідно з ГОСТ	води
3.2 Ковпачки алюмінієві	ТУ У 25206109.001-2001	Усі вимоги згідно ТУ У	Для первинного пакування готової продукції
3.3 Папір етикетковий	ГОСТ 7625-86	Усі вимоги згідно ГОСТ	Для етикетування первинної тари
3.4 Пачка картонна	ОСТ 64-071-89	Усі вимоги згідно ОСТ	Для вторинного пакування готової продукції
3.5 Пробки гумові	ТУ У 25.1-00152253.037-2004	Усі вимоги згідно ТУ У	Для первинного пакування готової продукції
3.6 Флакони скляні	ТУ 9461-010-00480514-99	Усі вимоги згідно ТУ У	Для первинного пакування готової продукції
3.7 Фільтри вискоефективної очистки	ДСТУ EN 1822-1-2001	Ефективність фільтрації не менш за 99,999995% та інші показники згідно з ДСТУ	Для підготовки повітря
3.8 Фільтри грубої та тонкої очистки	ГОСТ 30528-97	Ефективність фільтрації не менш за 80-90% і 95- 98% та інші	Для підготовки повітря

		показники згідно з ГОСТ	
3.9. Фарба глибокого друку для скляних виробів	ГОСТ 28196-89	Усі показники згідно вимогам ГОСТ	Маркування готової продукції
3.10 Блістер	ГОСТ 1727-2014	Усі показники згідно вимогам ГОСТ	Для вторинного пакування готової продукції

4.3. Опис технологічного процесу

ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка персоналу

Працівники, які працюють на біотехнологічному виробництві повинні мати необхідну кваліфікацію та практичний досвід, також пройти інструктаж з охорони праці, ознайомитись з інструкцією з техніки безпеки про роботу, яка буде виконуватись працівником. Всі працівники повинні бути ознайомлений з принципами належної виробничої практики (GMP), що мають відношення до його діяльності. Виробник повинен забезпечити навчання всього персоналу, чії обов'язки стосуються перебування у виробничих та складських приміщеннях і лабораторіях контролю, а також, чії обов'язки можуть вплинути на якість продукції.

На додаток до базової підготовки з теорії та практики систем управління якістю та GMP, кожен новий працівник повинен пройти підготовку, що відповідає його обов'язкам.

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		73

При прийомі на роботу необхідно пройти медичний огляд. Після первинного медичного огляду подальші медичні огляди повинні проводитися періодично (1 раз на рік), а також за необхідності.

Якщо у працівника інфекційні захворювання або відкриті рани на відкритих частинах тіла, то вживаються всі заходи, щоб такі працівники не були залучені до виробництва. Всі особи, які входять у виробничі зони, повинні носити захисний одяг, що відповідає виконуваній роботі. Персонал повинен бути проінструктований, щодо санітарно-гігієнічних вимог і правил гігієни.

На виробництві працівники забезпечуються технічним одягом та засобами індивідуального захисту. Технічний одяг працівників повинен відповідати класу чистоти робочого місця і його основне призначення - захищати продукт виробництва від потрапляння частинок.

У виробництві використовуються класи очищення В (А), С і D.

Клас D Волосся і борода (якщо є) повинні бути покриті. Обов'язково. Необхідно носити халат або брючний костюм, технологічне взуття, косинку.

Клас С: Волосся, борода і вуса (якщо є) повинні бути покриті. Необхідно носити комбінезони або штани з щільними щиколотками і високими комірами, а також відповідне взуття або бахіли. Вони не повинні містити волокон і частинок, а також не повинні розшаровуватися.

Клас В(А): Головні убори повинні повністю закривати голову і бути прикріплені до коміра костюма, також слід носити маску для обличчя. Необхідно носити належним чином простерилізовані гумові або пластикові рукавички та стерильні або продезінфіковані бахіли. Нижній край штанів повинен бути в калошах, а рукави одягу - в рукавичках. Кожен працівник, який працює в приміщенні класу В, повинен бути забезпечений

										Арк.
										74
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДП 6218. 00.000 ПЗ					

чистим, стерильним (простерилізованим або належним чином продезінфікованим) захисним одягом на кожну зміну. Рукавички слід регулярно дезінфікувати під час роботи. Контроль мікробіологічного забруднення рук, частота - не рідше двох разів на тиждень і один раз на два тижні - після обробки рук дезінфікуючим розчином[70].

ДР 1.2 Приготування миючих і дезінфікуючих розчинів

Миючі та дезінфікуючі розчини необхідно контролювати на предмет мікробіологічної чистоти. Ці розчини слід зберігати в попередньо очищених контейнерах протягом установленого періоду часу.

Дезінфікуючі розчини для обробки обладнання та приміщень готуються відповідно до «Методичних рекомендацій щодо приготування та застосування робочих розчинів мийних, дезінфекційних, бактерицидних та антисептичних засобів» затверджених Наказом Міністерства охорони здоров'я України № 502 від 14 грудня 2001 року.

ДР 1.2.1 Підготовка розчину перекису водню

Для приготування розчину у скляну ємність додають 33%-й розчин H_2O_2 до питної води; для приготування 6% розчину додайте 180 мл перекису водню до 820 мл питної води. Цей дезінфікуючий засіб використовується для обробки приміщень і в поєднанні з миючими засобами для корозійностійкого обладнання зі скла або полімерних матеріалів. Отриманий розчин можна зберігати протягом 5 днів.

ДР 1.2.2 Підготовка розчину хлоргексидину біглюконату

Розчин хлоргексидину біглюконату слід розвести 1:40 хлоргексидину біглюконату (20% мас.дол.) в етанолі (70% мас.дол.), відфільтрувати через мембранний фільтр з порами розміром 0,45 мкм і залити в стерильний контейнер. Приготований розчин хлоргексидину

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		75

біглюконату можна зберігати в герметично закритій скляній ємності протягом одного місяця.

ДР 1.2.3 Підготовка мийних та мийно-дезінфікуючих розчинів

Приготування розчинів синтетичних миючих засобів здійснюється в реакторі, що перемішується при 40 об/хв і нагрівається до 40-50°C, в наступному співвідношенні: на 10 літрів питної води необхідно 50 мл миючого засобу. Отриманий розчин миючого засобу використовується для очищення виробничого обладнання та миття вузлів обладнання[71].

ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень

Підготовка виробничих приміщень є одним з найважливіших заходів для забезпечення чистоти та мінімізації механічного та мікробіологічного забруднення. Контроль мікробного забруднення проводиться не рідше одного разу на тиждень, під час виробничого процесу і за 1,5 години до початку роботи; не припустимо ріст мікроорганізмів у двох паралельних чашках Петрі зі змивів з площі 10 x 10 см.

Підготовку виробничих приміщень можна розділити на щоденне прибирання та генеральне прибирання. Роботи з очищення та дезінфекції проводяться в захисних окулярах, гумових рукавичках і гумовому фартусі.

Щоденне прибирання виробничого обладнання проводять перед початком виробничого процесу за наступною схемою:

- Пил на поверхнях, таких як столи, стіни, вікна, обладнання та інвентар, слід видаляти шляхом протирання ганчіркою або серветкою, змоченою в дезінфікуючому розчині хлоргексидину біглюконату.
- Під час обідньої перерви вмикаються дезінфекційні лампи на 30 хвилин, щоб знищити мікроорганізми, які переносяться повітрям.

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		76

Після одноразового використання інвентар (наприклад, ганчірки) слід замочити в 5% розчині хлорного вапна щонайменше на 2-3 години, нейтралізувати, промити питною водою, висушити на повітрі і використовувати повторно. Після очищення відпрацьовану рідину та ополіскувач необхідно відправити на утилізацію відходів.

Генеральне прибирання також слід проводити кожні 5-6 днів або негайно на вимогу бактеріолога. При цьому приміщення обробляють теплим розчином синтетичного миючого засобу при кімнатній температурі 40-50°C, а потім дезінфікують дезінфікуючим засобом хлоргексидину біглюконату. Очищення слід проводити наступним чином:

- Стіни обприскують дезінфікуючим засобом з пульверизатора з розрахунку 150-200 мл/м²;
- Підлоги миють спочатку миючим, а потім дезінфікуючим розчином.
- Вікна, двері та поверхні обладнання протирають ганчіркою, змоченою в дезінфікуючому розчині.
- Ваги, корозійні частини обладнання, задіяні у виробничому процесі, та електричні освітлювальні прилади протирають ганчіркою або серветкою, змоченою в дезінфікуючому розчині.

Після обробки вмикають стельові бактерицидні світильники на 10-12 годин і щонайменше за 30 хвилин перед початком роботи відкривають вентиляцію для ламінарного потоку.[72].

ДР 1.4 Підготовка виробничого обладнання

ДР 1.4.1 Миття і дезінфекція обладнання та комунікацій

Підготовка технічного обладнання полягає в очищенні та стерилізації знімних частин (вузлів) або обробці внутрішніх і зовнішніх частин дезінфікуючими засобами. Її проводять безпосередньо до та після

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		77

технологічного процесу. Знімні частини (вузли) обладнання, що безпосередньо контактують з поживними середовищами, посівною масою або культуральними середовищами, повинні бути зняті, розібрані і ретельно очищені 0,5% розчином миючого засобу ДР 1.2.3 при температурі 60 °С і кілька разів промиті дистильованою водою. Демонтаж і зняття компонентів повинен виконуватися спеціалізованим персоналом.

Внутрішню частину обладнання необхідно обробити розчином миючого засобу при температурі 60 °С, а потім кілька разів промити очищеною водою. Внутрішні поверхні обладнання в приміщеннях класів очищення С і D необхідно обробляти питною водою і, за необхідності, 0,5% розчином миючого засобу за температури 60 °С. Фільтри, що підлягають регенерації, необхідно мити мильною водою з дезінфікуючим розчином.

Повна дезінфекція обладнання та комунікацій проводиться 1-2 рази на рік 6% розчином перекису водню або іншим дозволеним антисептичним засобом. Щоб провести дезінфекцію обладнання, його повністю заливають дезінфікуючим розчином і витримують при температурі 55-65°С протягом 1,5-3,0 годин. Зовнішні металеві поверхні обробляють етиловим спиртом, неметалеві - водою з перекисом водню. Частини обладнання, які знімаються слід занурювати в дезінфекційний розчин за тих же умов, що і для дезінфекції обладнання. Дезінфекція комунікацій проводиться шляхом передавлюванням розчину антисептика з однієї частини обладнання на іншу. Після обробки антисептиком обладнання та засоби зв'язку слід кілька разів промити питною водою та контролюючи якість промивних вод. Відпрацьований розчин і промивні води відправляються на етап переробки відходів. Зовнішні поверхні обладнання обробляються так само, як і при підготовці виробничих приміщень.

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		78

Щоденна дезінфекція обладнання проводиться шляхом обробки зовнішніх поверхонь обладнання та комунікацій дезінфікуючим засобом на основі перекису водню і питної води та візуального контролю якості обробки.

ДР 1.4.2 Перевірка обладнання на герметичність

Якщо обладнання негерметичне, повна стерилізація може не дати ефекту. Щоб перевірити герметичність контейнерного обладнання, треба створити надлишковий тиск 0,5 МПа і спостерігати за показниками манометра протягом 30 хвилин. Якщо значення залишається незмінним протягом цього часу, обладнання вважається герметичним.

Особливу увагу слід звернути на герметичність фланцевих з'єднань і кришок обладнання. Для їх перевірки використовують мильний розчин під надлишковим тиском 0,5 МПа. У разі виявлення негерметичності з'єднань, обладнання та комунікації необхідно демонтувати і провести профілактичну герметизацію. З'єднання підтягнути і знову упакувати, а також затягнути кришки обладнання і з'єднання. За необхідності замінюють прокладки кришок та люків.

Перед установкою всі вентелі перевіряються гідравлічним випробуванням під тиском 0,3 МПа. Для ущільнення фланців і клапанів використовуються спеціальні прокладки з параніту, оброблені графітом, для ущільнення кришок пристроїв - гумовотканинні дроти діаметром до 19 мм, а для завантажувальних люків - гума товщиною 14 мм. Показання манометра повинні залишатися постійними під впливом стиснення, що виникає на пристрої та прилеглому телекомунікаційному обладнанні.

ДР 1.4.3 Стерилізація обладнання

Відповідно до вимог GMP, там, де це можливо, використовуються системи "очищення на місці" та "стерилізація паром на місці". Перед

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		79

стерилізацією обладнання та комунікацій їх промивають питною водою при температурі 100°C з магістрального трубопроводу.

Для видалення повітря з обладнання під час стерилізації, під кришку ферментатора подається гаряча пара, а повітря видаляється через барботер. Видалення повітря з нижніх з'єднань дозволяє швидше досягти необхідної температури стерилізації, ніж якщо пароповітряна суміш видаляється з верхніх з'єднань.

Обробка обладнання та комунікацій насиченою парою при 125-145°C забезпечує досягнення необхідного рівня стерильності.

Порожнє обладнання та прилеглі до них комунікації стерилізують при температурі 120-126°C протягом однієї години під надлишковим тиском 0,3 МПа.

Особливу увагу слід приділити стерилізації комунікаційного обладнання для подачі піногасника. Ці компоненти стерилізують при 125-135°C протягом 1,5-2 годин під тиском 0,3 МПа. Наведений час стерилізації не враховує час, необхідний для видалення повітря та нагрівання контейнерного обладнання.

Стерилізація повітряного фільтра та прилеглого комунікаційного обладнання відбувається одночасно зі стерилізацією виробничого обладнання, а відпрацьовані пари з фільтра потрапляють у ферментер. Фільтри стерилізуються насиченою парою протягом 2 годин при температурі 110°C під надлишковим тиском 0,4 МПа.

Фільтри для остаточного очищення не витримують термічної стерилізації і тому стерилізуються хімічним способом. Для цього на стерильній ділянці трубопроводу встановлюється клапан. Сам фільтр і ділянка від фільтра до вентилі стерилізуються за допомогою оксиду

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		80

етилену і формаліну. Ділянка від вентиля до ферментера разом з обладнанням стерилізується гострою парою.

Пробовідбірник, посівний штуцер та зливна лінія ферментера обробляються парою протягом 30 хвилин для завершення стерилізації.

Під час фази стерилізації контролюють температуру, тиск насиченої пари, час стерилізації та наявність сторонньої мікрофлори.

Сублімаційні сушильні шафи необхідно стерилізувати перед кожним завантаженням. Максимальний час між стерилізацією і початком циклу ліофільного сушіння повинен бути суворо обмежений. Дезінфекція не повинна замінювати стерилізацію[73].

ДР 2 Підготовка повітря

ДР 2.1 Підготовка вентиляційного повітря

Припливне повітря в приміщеннях класу D можна очищати за допомогою фільтра першого ступеня, з класом очищення C можна очищати лише у два ступені, а припливне повітря в приміщеннях з класом очищення B (A) - у три ступені.

ДР 2.1.1 Забір повітря з атмосфери

Підготовка вентиляційного повітря починається після його видалення з атмосфери. Забір повітря здійснюється за допомогою трубчастих конструкцій. Повітрозабірники розміщуються на висоті 8-10 метрів у місцях з найменшою запиленістю та загазованістю.

ДР. 2.1.2 Попередня очистка повітря

Попереднє очищення (G3-G4) очищає повітря від механічних частинок, в тому числі пилу, крапель води і деяких мікроорганізмів. Фільтр встановлюється на лінії всмоктування перед компресором і видаляє

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		81

частинки розміром більше 5 мкм. Ефективність фільтрації становить 80-90%. Фільтри періодичної дії є кращим вибором, оскільки поверхня фільтра повинна регулярно регенеруватися для досягнення необхідного ступеня чистоти повітря. До фільтрів періодичної дії відносяться касетні регенеративні масляні фільтри та сухі касетні фільтри. Для очищення повітря від механічних частинок широко використовуються комірчасті фільтри конструкції Рекка (ФЯР) з гофрованої масляної сітки. Час роботи без регенерації залежить від ступеня забруднення повітря. Вміст пилу вище 5,0 мг/м³ скорочує термін служби фільтра[74].

Повітря такого ступеня чистоти підходить для приміщень класу D.

ДР 2.1.3 Транспортування повітря

При транспортуванні повітря стискається, а потім подається в систему повітропостачання. Мета цього етапу - забезпечити наявність потрібної кількості повітря під тиском, який відповідає вимогам технологічного процесу. Повітря стискається компресором. Компресор адіабатично стискає повітря до тиску 0,2 МПа і, відповідно, нагріває повітря до 120 °С.

ДР 2.1.4 Кондиціонування повітря

Очищене від механічних частинок повітря подається в центральний кондиціонер, поступово нагрівається в секції нагрівача, в секції охолоджувача охолоджується і знову нагрівається до 18-20 °С. Потім нагріте повітря направляється в паровий зволожувач. Повітря з парового зволожувача направляється на фільтр тонкого очищення[75].

ДР 2.1.5 Тонка очистка повітря

Другий етап очищення повітря (F5-F9) виконується фільтром тонкого очищення ФПП, розташованим безпосередньо перед повітророзподільником, який фільтрує повітря від бактерій і твердих

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		82

домішок при концентрації пилу 0,5 мг/м³. Ефективність очищення повітря на цьому етапі становить 95-98%. До і після фільтра встановлені манометри для виявлення перепадів тиску. Повітря з таким ступенем очищення підходить для використання в приміщеннях класу С. Манометри встановлюються до і після фільтра для виявлення перепадів тиску.

ДР 2.2 Підготовка стерильного аераційного повітря

ДР 2.2.1 Забір повітря з атмосфери

Використовують повітрозбірник, подібний до ДР 2.1.1, для відбору проб повітря з висоти 8-10 м.

ДР 2.2.2 Попереднє очищення повітря та його стиснення

Попереднє очищення необхідне для захисту компресора від передчасного зносу. На цьому етапі повітря попередньо фільтрується для видалення грубих частинок і пилу. На цьому етапі з повітря видаляється більшість великих частинок пилу розміром 5-10 мікрон. У фільтрах попереднього очищення використовуються губчасті фільтри з модифікованого пінополіуретану. Ефективність пінополіуретану по вловлюванню пилу в повітрі становить 85%, а пилоємність - 0,2 кг/м². Максимальна робоча температура пінополіуретану становить 121°C. Манометри встановлені до і після фільтра для контролю перепаду тиску.

Механічно очищене повітря потрапляє в компресор, де адіабатично стискається до тиску 0,3 МПа. Цей тиск необхідний для подолання гідродинамічного опору системи транспортування повітря та стовпа культуральної рідини у ферментері. Стиснене повітря нагрівається до 150°C.

ДР 2.2.3 Охолодження повітря та згладжування коливань витрат

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		83

Оскільки при стисненні повітря виділяється багато тепла, після компресора повітря потрапляє в трубчастий теплообмінник, де охолоджується. Охолоджувальним середовищем є питна вода. Щоб видалити надлишок води з повітря, його необхідно охолодити нижче точки роси. У водяному теплообміннику повітря охолоджується до робочої температури 37 °С, а водяна пара, що міститься в повітрі, конденсується. Конденсована вода видаляється з системи, а загальний вміст вологи в повітрі знижується на 50-70%.

Перед фільтром встановлений ресивер, який вирівнює тиск в системі, забезпечує рівномірну подачу повітря на фільтр і видаляє краплі води і масляний туман. У ресивер надходить охоложене теплообмінником повітря. Волога з крапель води, що утворюється при охолодженні, уловлюється при проходженні повітря через ресивер і багаторазово змінює напрямок в той час, як контактує з насадкою ресивера. Конденсат відводиться в каналізацію. Повітря виходить з ресивера під тиском 0,3 МПа. Нерухома труба охолоджується колосниковим кожухом і трубчастим теплообмінником. Вологість повітря на виході становить 60%.

ДР 2.2.4 Очищення повітря на головному фільтрі

Основний фільтр очищає щонайменше 98% повітря від мікробних клітин розміром від 1 до 1,5 мкм (кількість клітин не повинна перевищувати 10 на 1 м³ повітря, що фільтрується). Для очищення повітря на цьому етапі використовується фільтрувальний матеріал з поліамідного волокна. Ефективність фільтра перевіряється за різницею тиску до і після фільтра за допомогою манометра.

ДР 2.2.5 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Для тонкого очищення повітря використовуються окремі фільтри, які повинні очищати 99,99995% повітря від частинок діаметром 0,3 мкм. Фільтри такого розміру піддаються хімічній стерилізації разом з

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		84

прилеглими комунікаціями. У промисловості в фільтрах тонкого очищення найчастіше використовують тонковолокнисті фільтрувальні матеріали. Вони недорогі, мають низький гідравлічний опір(0,01-0,03 МПа) і високу пилоємність.

Очищене стерильне повітря подається до барботерів в посівному апараті та ферментері, а також на стадію ліофільного сушіння. Температура на виході становить 37°C.

ДР 3 Підготовка води очищеної

Питна вода використовується для початкового миття обладнання, пляшок і кришок, а також для прибирання приміщень.

Очищена вода використовується для приготування інгредієнтів поживних речовин і захисних середовищ, для остаточного очищення всередині обладнання та для остаточного очищення флаконів і кришок.

Очищена вода готується з питної води, яка повинна відповідати вимогам ДСанПіН 2.2.4-171-10 "Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною". Питна вода є джерельною водою, допущеною для отримання води фармацевтичної якості.

Вода очищена виробляється відповідно до СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013. Очищена вода використовується у процесі виробництва фармацевтичної продукції, що не вимагає стерильності та/або асептики.

ДР 3.1 Підігрів і термостатування

Питна вода подається по трубопроводу для виробництва очищеної води до теплообмінника, який має сорочку, яка забезпечує необхідну температуру. Нагріваючи питну воду до 20°C, можна підтримувати продуктивність мембрани зворотного осмосу на необхідному рівні.

ДР 3.2 Грубе очищення води

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		85

На цьому етапі знижується концентрація органічних сполук і хлору у воді. Тиск рідини до і після фільтра повинен становити 0,6 МПа. Це контролюється за допомогою манометра.

ДР 3.5 Очищення води у системі зворотнього осмосу

Насос з постійним тиском і постійною продуктивністю подає воду до мембранного модуля зворотного осмосу. Мембранний модуль зворотного осмосу має здатність затримувати 99,6% води. Домішки видаляються шляхом пропускання води через напівпроникну мембрану під тиском, що перевищує осмотичний тиск. Обладнання являє собою мембранну систему з розміром пор 0,0005-0,001 мкм. Системи зворотного осмосу контролюються шляхом вимірювання питомої електропровідності води на виході з системи. Питома електропровідність чистої води становить 4,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ при 20°C.

Концентрат, що виходить з системи зворотного осмосу, має досить високий тиск і не становить особливих труднощів для транспортування до місця скидання або утилізації. Відокремлений концентрат скидається в каналізаційну систему. Манометри та стаціонарні диференціальні витратоміри встановлюються на локальному трубопроводі перед входом в магістральний трубопровід. Стаціонарний диференціальний витратомір встановлюється після системи зворотного осмосу. Таким чином, вода опріснюється шляхом видалення органічних сполук і подається в резервуар чистої води.

ДР 3.6 Надходження води очищеної у збірник

Збірник оснащений сорочкою для регулювання температури. Чиста температура води на виході становить 20 °С. Пристроєм для її регулювання є термоперетворювач. Колектор обладнаний датчиком безперервного контролю рівня води.

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		87

На виході збірника встановлений циркуляційний насос, тиск води на виході з якого контролюється манометром. При необхідності вода від насоса повертається у збірник по локальному трубопроводу, а перед входом в збірник через відповідний штуцер встановлюється модуль для вимірювання питомої електропровідності і температури води і термоперетворювач, потім встановлюється ротаметр для визначення об'ємної витрати за одиницю часу.

Рівень води в збірнику контролюється автоматичним датчиком рівня. Залежно від кількості накопиченої води автоматично запускається або припиняється її видобуток. Коли кількість води в збірнику досягає мінімуму, запускається режим, який забороняє подальше використання. Температурні датчики, встановлені в кільцевому трубопроводі, відстежують температуру води в режимі онлайн і запускають систему евакуації, коли температура піднімається вище 20°C внаслідок тривалої роботи циркуляційного насоса або тривалої відсутності потоку води. Потім температура знижується в міру вироблення чистої води.

Колектор оснащений ультрафіолетовими лампами, випромінювальна здатність яких контролює правильне значення. УФ-випромінювання з довжиною хвилі 185 і 245 нм фотохімічно окислює воду, видаляючи сліди органічних сполук у воді і вбиваючи мікроорганізми; УФ-випромінювання з довжиною хвилі 254 нм використовується для запобігання розмноженню бактерій у накопичувальному резервуарі.

Здійснюється моніторинг загальної кількості життєздатних аеробних мікроорганізмів в очищеній воді. Для моніторингу несприятливих тенденцій встановлюються попереджувальні ліміти та ліміти необхідних дій. За нормальних умов кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів 100 м.о. на 1 мл є відповідною межею для вжиття заходів. Вимірювання проводять методом мембранної фільтрації. Використовується

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		88

концентроване поживне середовище, яке інкубується при температурі від 30°C до 35°C протягом 5 днів. Кількість досліджуваного зразка залежить від очікуваних результатів.

Готова чиста вода з збірника розподіляється по трубопроводу на відповідні технічні процеси.

ДР 4 Підготовка скляних флаконів та гумових пробок

Готовий продукт являє собою сублімовану масу мікроорганізмів, розфасовану в скляні флакони по 5 мл і закупорену гумовою пробкою або алюмінієвим ковпачком через гігроскопічну природу продукту. Скляні флакони, гумові пробки та алюмінієві ковпачки проходять наступні процеси підготовки

ДР 4.1 Мийка та ополіскування тари

Флакони, гумові пробки та ковпачки миють у мийній машині розчином миючого засобу та ополіскують питною водою. Тару слід ополіскувати при температурі 40-60 °C протягом 20 хвилин.

ДР 4.2 Сушка тари

Після миття та ополіскування їх сушать. Це робиться в сушильній шафі при температурі 105°C протягом 1 години. Посуд стерилізують в автоклаві при температурі 121°C протягом 1 години. Під час кожного автоклавування використовується термоіндикатор як додатковий метод контролю.

Скляні флакони, гумові пробки та алюмінієві ковпачки поміщаються в шафу для зберігання та пакування готової продукції. Використані миючі та відпрацьовані рідини зливаються і відправляються на стадію з переробки відходів.

ДР 5 Підготовка робочих розчинів

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		89

ДР 5.1 Приготування 20% розчину NaOH

Для приготування 20% розчину NaOH для гідролізу клітинних стінок лактобактерій, у збірник засипаємо 4 кг гідроксиду натрію, який зважують на електричних вагах, доводять загальний об'єм до 20 л водою питною, перемішують 5 – 10 хв. Стерилізацію здійснюють при температурі 120-122°C протягом 40 хв.

ДР 5.2 Приготування 14% розчину HCl

Для приготування 14% розчину HCl для нейтралізації осаду клітинного матеріалу та кислотної денатурації білка, у збірник наливаємо 2,8 л концентрованої HCl, який зважують на електричних вагах, доводять загальний об'єм до 20 л водою питною, перемішують 5 – 10 хв. Стерилізацію здійснюють при температурі 120-122°C протягом 40 хв.

ДР 5.3 Приготування 1% розчину лізоциму

Для приготування 1% розчину лізоциму для лізису клітинного матеріалу, у збірник засипаємо 4 г лізоциму, який зважують на електричних вагах, додають 40 мл води питної, перемішують доки лізоцим повністю не розчиниться (можна використовувати магнітну мішалку для швидкого розчинення). Потім доводять загальний об'єм до 400мл та добре перемішують. Стерилізацію здійснюють при температурі 120-122°C протягом 40 хв. Зберігається при температурі 2-8°C. Перед використанням потрібно перевіряти, щоб розчин мав прозорий вигляд та не містив осаду.

ДР 6 Підготовка поживних середовищ та допоміжних речовин

ДР 6.1 Приготування розчинів для титрування

Готується 6% розчин NaOH, щоб довести рН розчину поживного середовища до потрібного значення. Додають 1,2 кг сухого гідроксиду натрію в реактор і доводять загальний об'єм до 20 л питною водою.

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		90

Готують 6% розчин HCl для доведення рН розчину середовища до необхідного значення і рН культуральної рідини після ферментації. Додають 3 л концентрованої HCl в реактор і доводять загальний об'єм до 50 л питною водою.

Титрант стерилізують при температурі 120-122°C і тиску 0,12 МПа протягом 40 хв.

ДР 6.2 Підготовка стерильного поживного середовища МРС для отримання посівного матеріалу

ДР 6.2.1 Змішування і стерилізація середовища для отримання посівного матеріалу

Одержання посівного матеріалу *Lactobacillus delbrueckii* здійснюють на рідкому середовищі МРС-1 (г/л):

- Рибний гідролізат— 10,0;
- дріжджовий екстракт — 10,0;
- глюкоза — 10,0;
- MgSO₄·7H₂O — 0,2;
- MnSO₄·5H₂O — 0,05;
- Цитрат натрію (E331) – 5,0;
- Калій фосфорнокислий двозаміщений - 2,0;
- Вода дистильована - до 1 л [1].

Стерилізація гарячою парою проводиться при 125 °С протягом години при надлишковому тиску 0,05 МПа безпосередньо в апараті.

ДР 6.2.2 Охолодження середовища для отримання посівного матеріалу

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		91

Стерилізоване середовище необхідно охолодити шляхом подачі технічної холодної води в сорочку реактора до температури 39 ± 1 °C та довести рН середовища до 6,6-6,8 стерильним розчином NaOH .

ДР 6.3 Підготовка стерильного поживного середовища МРС для виробничого біосинтезу

ДР 6.3.1 Змішування і стерилізація середовища для виробничого біосинтезу

Культивування штаму *Lactobacillus delbruecki* здійснюється на збалансованому поживному середовищі, %:

- Калій фосфорнокислий однозаміщений – 0,18
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,015
- $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,005
- Цукор-пісок – 0,8
- Ферментолізат казеїну – 1,8
- Ферментолізат борошна соєвого – 0,8
- Екстракт дріжджовий – 1,8
- Екстракт кукурудзяний – 0,4

З метою одержання стабільних результатів, а також для економії часу та енерговитрат ферментолізати і дріжджовий екстракт використовують в готовому, сухому вигляді. Змішуються всі компоненти ПС та стерилізують в ферментері при температурі 126-128°C протягом 40 хв.

ДР 6.3.2 Охолодження середовища для виробничого біосинтезу

Стерилізоване середовище необхідно охолодити шляхом подачі технічної холодної води в сорочку реактора до температури 40°C [1].

ДР 6.4 Підготовка декстрану 70

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		92

У збірнику 180г декстран 70 у вигляді порошку розчиняють у 270мл води та перемішують 5-10 хвилин. Потім стерилізують при 110 °С та 0,05 МПа протягом 30 хв.

ТП 7 Отримання посівного матеріалу

Технологічний процес проводять в приміщенні класу чистоти В.

На даному етапі обов'язково контролюється мікробіологічна чистота, інтенсивність накопичення біомаси, кількість живих клітин, температура, рН.

ТП 7.1 Відновлення музейної культури

У флакони з ліофілізованою робочою культурою *Lactobacillus delbruecki TS1-06* (10^7 КУО/см³) додають 1 мл стерильного фізіологічного розчину NaCl, струшують ретельно перемішуючи. У пробірки з попередньо приготованим поживним середовищем МРС-1 пересівають розчинений вміст з флакону у стерильних умовах та інкубують у термостаті при $40\pm 1^\circ\text{C}$ протягом 24 годин. Мікробіологічний контроль культур на МПА здійснюється шляхом мікроскопії та посіву на МПА 5% глюкози та агар-агар Сабуро (для виявлення екзотичної бактеріальної та грибкової мікрофлори відповідно). Культури на МПА інкубують у термостаті та середовищі Сабуро протягом 48 годин при $(38\pm 1)^\circ\text{C}$ та інкубують протягом 72 годин при $(22\pm 1)^\circ\text{C}$. За відсутності екзотичної мікрофлори культури першого покоління використовують як посівний матеріал для отримання культур другого покоління [70].

ТП 7.2 Отримання посівного матеріалу в колбах

Із пробірок пересівають вирощену культуру *Lactobacillus delbruecki TS1-06* в 10 колб на 1 л, що містить 500 мл стерильного середовища поживного середовища МРС (з ДР 6.2), використовуючи мікробіологічну петлю. Колби закривають ватно-марлевою пробкою. Колби ставлять на

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		93

термостат і підтримують температуру (40 ± 1) °С при періодичному перемішуванні. Посіви інкубують протягом 24 годин при вказаній температурі. Через 40 годин проводять мікробіологічний контроль, як описано вище.

ТП 7.3 Отримання посівного матеріалу в інокуляторі

На цьому етапі однодобову культуру лактобактерій пересівають з колб в інокулятор на 100 дм³ з заповненням 0,5. При ввімкненій мішалці та барботері заливають 46 дм³ стерильного поживного середовища (з ДР 6.3). Потім через посівний штуцер інокулятор засівають культурою в об'ємі 5 дм³ з колб. Перед інокуляцією подачу повітря до інокулятора припиняють і повністю знижують тиск. Потім закривають запобіжний клапан. Перед розпиленням препарату за допомогою палаючого пальника створюють зону полум'я навколо посівної насадки. Потім обережно відкручують пробку.

Край пляшки з посівним матеріалом обпікається полум'ям пальника і вміст переноситься в інокулятор. Потім повністю відкривають впускний клапан, щоб знову ввести повітря в сівалку, і регулюють вихід повітря, щоб підтримувати надлишковий тиск в межах 10^4 Па. Відразу після посіву проводиться мікробіологічний контроль.

Продукт інкубують протягом 8-16 годин при температурі (39 ± 1) °С при регулярному перемішуванні. Ретельне перемішування культури необхідне для забезпечення рівномірного розподілу поживних речовин між клітинами та уникнення накопичення токсичних метаболітів в окремих частинах реактора. Крім того, ферментатор повинен мати функціональну можливість розподіляти продукт по пляшках для подальшого сублімаційного сушіння. Корегування рН в процесі росту культури не проводять. Через 24 години проводять мікробіологічний контроль і визначають кількість життєздатних клітин за методом Коха в

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		94

агаризованому середовищі МРС (повинно бути не менше 10^8 КУО/см³)[77].

ТП 8 Культивування продуцента у ферментері

У виробничому ферментері об'ємом 1м³, коефіцієнт заповнення 0.5, який повинний бути обладнаний паровою сорочкою для стерилізації поживного середовища (з ДР 6.3), методом глибинного культивування отримують виробничу культуру. Біореактор оснащений обладнанням для вимірювання та регулювання температури і рН середовища.

Для забезпечення анаеробних умов культивування у ферментер подають суміш вуглекислого газу та азоту, яка замінює повітря. В якості інертних газів також можна використовувати аргон, вуглекислий газ, водень і гелій. Однак найзручніше використовувати суміш вуглекислого газу з азотом, оскільки азот повністю заміщує кисень у ферментері, а вуглекислий газ запобігає забрудненню середовища сторонніми мікроорганізмами.

В асептичних умовах пересівають отриманий посівний матеріал з інокулятора (у кількості 10% від кількості поживного середовища) у біореактор, що містить 460 дм³ підготовленого поживного середовища (з ДР 6.3). Культивування біомаси лактобактерій проводять при температурі $(39 \pm 1)^\circ\text{C}$ з постійним перемішуванням 200 об/хв. Ріст культури в ферментері супроводжується закисанням поживного середовища до рН=3,8-4,2, збільшення оптичної густини культурального середовища. Біомасу контролюють за показником оптичної густини за довжини хвилі 450 нм, концентрацію живих клітин - за методом Коха. Через 12 год культивування при стабілізації росту культури (рН=4,0, оптична густина не змінюється), процес культивування припиняють. Після цього культуральну рідину в ферментері охолоджують до температури 20°C.

ТП 9 Відокремленні біомаси

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		95

Відокремлення біомаси бактерій від культурального середовища відбувається методом сепарування за допомогою сепаратору Westfalia при подачі за швидкістю 250-300 л/год. Отриману вологу біомасу з $W=75\%$ направляють на стадію лізису або на сублимаційну сушарку (при подальшому зберіганні), а рідку фракцію направляють на знешкодження.

ТП 10 Лізис біомаси

ТП 10.1 Лужний гідроліз

ТП 10.1.1 Гідроліз клітинних стінок розчином NaOH 20%

У збірник зі змішувачем додають 4 кг вологої біомаси та 6 л очищеної води. Суспензію перемішують 30-40 хвилин до гомогенного стану за допомогою мішалки. Під час перемішування в суспензію додають 20% розчин NaOH до моменту коли $pH=7,0$. Потім в реактор додають ще 4 л очищеної води та нагрівають суміш до температури $45^{\circ}C$ та додають 2 л 20% розчин NaOH. Процес гідролізу проводиться протягом спершу 2 годин при температурі суспензії $40-45^{\circ}C$, при подальшому нагріванні до $t=55^{\circ}C$ протягом 1 годин, а потім витримують 2 години при $t=58^{\circ}C$. Після закінчення гідролізу проводять охолодження суспензії циркулюванням холодної води в сорочці реактора до $20^{\circ}C$.

ТП 10.1.2 Центрифугування

Суспензію центрифугують за допомогою центрифуги Vactofuge при 12000 об/хв протягом 10 хвилин. Мінімальний діаметр частинок, що розділяються, становить $5,10^{-4}$ мм. Фугат подається через локальні трубопроводи до резервуару нейтралізації перед скиданням у центральну каналізаційну систему.

ТП 10.2 Нейтралізація

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		96

Осад з центрифуги направляють в бутель і нейтралізують 14% розчином HCL до моменту коли рН=6,0±0,1 при перемішуванні. Потім його центрифугують при 12000 об/хв протягом 10 хвилин та промивають.

ТП 10.3 Лізис розчином лізоциму

Готують суспензію у реакторі з клітинного матеріалу та 10 л очищеної води і доводять до рН=7,0±1 стерильним розчином NaOH. В реактор доливають 30-40 мл хлороформа для виключення бактеріального забруднення. Суспензія з клітинним матеріалом прогривають до t=38±1°C, після чого через завантажувальний люк додають 300 мл розчину лізоциму з масовою часткою 1% та постійно перемішують. Процес проводять протягом 2-10 годин, при цьому постійно контролюється рН та температура. Зміна оптичної густини ($\lambda=450$ нм) означає закінчення процесу лізису. Після внесення лізоциму через 2-3 хв відбирають пробу суспензії і вимірюють оптичну густину при $\lambda=450$ нм та товщині поглинання шару 1 см. Потім розводять в 100-200 разів суспензію. І кожну годину відбирають проби для визначення рН та оптичної густини. Лізис клітин завершений, коли ступінь гідролізу (К) дорівнює 0,55.

$$K = \frac{D_{\text{вих}} - D_{\text{кін}}}{D_{\text{вих}}}$$

ТП 11 Центрифугування

Після закінчення лізису суспензію центрифугують за допомогою центрифуги Vastofuge при 20 000 об/хв протягом 10 хвилин. Супернатант збирають та направляють на стадію концентрування.

ТП 12 Концентрування

За допомогою роторного випарювача концентрують лізат при t=40°C під вакуумом до 4 л (ступінь концентрування- 5 разів).

										Арк.
										97
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДП 6218. 00.000 ПЗ					

ТП 13 Кислотна денатурація білків

До лізату лактобактерій додають 14% розчин HCL при цьому відбувається процес перемішування до моменту поки показник рН не досягне рівня рН=3,0.

ТП 14 Центрифугування

Закислений концентрат лізату центрифугують при 10000 об/хв протягом 10 хв. Супернатант переходить на стадію нейтралізації.

ТП 15 Нейтралізація та спиртоосадження пептидоглікану

Супернатант збирають в бутель та 20% розчином NaOH нейтралізують його до рН=7,0±0,1. До 4 л очищеного концентрату лізату додають 20 л етилового спирту (у співвідношенні 1:5), перемішують. Цю спиртову суміш витримують при кімнатній температурі (t=21±2°C) протягом 12 годин до утворення на дні бутеля щільного липкого осаду.

Потім спиртовий розчин, який є верхнім шаром зливають у відходи, а сам осад промивають 2 л етилового спирту та після промивки розчиняють осад в 4 л очищеної води.

ТП 16 Стандартизація препарату

До розчину лізату лактобактерій, отриманого на попередньому етапі, додають раніше підготовлений розчин декстран 70, підготовлений на етапі ДР 6.4. Перемішують до настання гомогенізації (протягом 10-15 хв). Для забезпечення стерильності препарату використовують стерилізуючу фільтрацію розчину через мембрани з розміром пор 0,2мкм, за допомогою фільтруючих матеріалів на основі поліетерсульфону. Вміст реактора слід мікробіологічно перевірити на наявність сторонньої мікрофлори в напівфабрикаті.

ТП 17 Наповнення флаконів

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		98

Стабілізований розчин лізату лактобактерій розливають по 2 см³ у флакони ємністю 5,0 см³ у фасувальній машині і заморожують у глибокій морозильній камері при -35 °С протягом 6 годин. Флакони повинні бути розміщені вертикально. Після заповнення та заморожування флакони слід накрити стерильною марлею та медичною клейонкою і перенести в сушильну шафу для запобігання контамінації під час транспортування.

ТП 18 Сублимаційне сушіння препарату

Після заморожування проводять сублимаційну сушку препарату у сублимаційній сушарці ТГ-50. Рідина випаровується з флакону під дією глибинного вакуума і заморожування, а згодом і через температуру у вигляді водяної пари. Щогодини температуру підвищують на 1-2°С до досягнення температури 0°С. Далі температуру підвищують на 2-3°С кожну годину досягаючи +40°С приблизно за 30 годин сушіння. Цю температуру підтримують протягом 8 годин. Весь процес займає 38 годин при $p = 10 \text{ Па}$ і кінцевий вміст вологи становить 4,8%. В кінці процесу сушіння камера відкривається і продукт вивантажують.

ТП 19 Закупорювання флаконів

Після закінчення процесу сублимаційної сушки флакони з висушеною мікробною масою закупорюються під вакуумом за допомогою напівавтоматичної системи. Флакони, які вже закупорені, вивантажуються і передаються в приміщення завальцовки флаконів. Вони накриваються алюмінієвими ковпачками і обкатують за допомогою пристрою для закупорювання флаконів [78].

ПМВ 20 Пакування, маркування, відвантаження готового продукту

В пачку за ОСТ 64-071-89 з картону коробкового за ГОСТ 7933-89 вкладають по 5 флаконів препарату пакуються в блістерну упаковку разом з інструкцією з його використання. На флакон фарбою глибокого друку

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		99

для скляних виробів за ТУ У 42.34.011—97 українською або мовою, що обумовлена в контракті на поставку наносять: назву препарату, кількість доз, номер серії, термін придатності. На флакони наклеюють етикетку з етикеткового паперу за ГОСТ 7625-86 що містить наступні дані: назву препарату латинською, українською, назва підприємства виробника, його адреса, товарний знак, номер партії, маса нетто, дата виготовлення, строк придатності до використання. Маркування виконується державною мовою і мовою, що обумовлена в контракті на поставку. На пачці та етикетці групової тари українською або мовою, що обумовлена в контракті на поставку наносять 9: «Україна», виробник, товарний знак та адресу, назву препарату латинською, українською або мовою, що обумовлена в контракті на поставку наносять, лікарську форму, кількість доз, кількість флаконів, «Для застосування перорально», умови зберігання, «Зберігати у недоступному для дітей місці», номер серії, реєстраційний номер, термін придатності, штрих-код, реєстраційний номер у країні імпортері (за потреби).

В коробку пакують по 20 пачок. Шви коробки заклеюються скотчем (кількість пачок також вказана на етикетці групового пакування). Упаковану готову продукцію транспортують на склад готової продукції та пакують у транспортну тару. Групова і транспортна тара відповідає ГОСТ 17768-90. Кількість упаковок також вказується на етикетках групового пакування. Транспортні етикетки відповідають ГОСТ 14192-77.

ЗВ 21 Знешкодження відходів та промислових викидів

Під час виробничого процесу утворюються різні види відходів, які підлягають знезараженню. Це знезараження некондиційного насіння, культуральної рідини, конденсату, промислових стічних вод та бракованих партій.

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		100

Некондиційний посівний матеріал з посівного апарата та некондиційна культуральна рідина з ферментера піддаються термічній обробці "гострою" паром в спеціальному апараті при температурі 130-132°C і тиску $P = 0,3$ МПа протягом (40 ± 5) хвилин, сорочка охолоджується подачею холодної води при температурі 25-30°C, розбавляють водою до окиснення 450-700 мг/л. Потім середовище доводять до рН 7,0 за допомогою соляної кислоти або розчину каустичної соди і скидають у заводську каналізацію.

Залишки синтетичного миючого засобу після обробки виробництва, промивні дезінфікуючі засоби та відпрацьовану воду направляються в бак нейтралізації стічних вод, розбавляється в 3-4 рази водою, доводиться до рН 7,0 розчином соляної кислоти або каустичної соди і зливається в загальнозаводську каналізацію. Після очищення посівного і виробничого ферментерів промивні води зливаються в той же самий збірник.

Тверді виробничі відходи, такі як склобій, рукавички, пакувальні матеріали та дефектні флакони, пробки та кришки, утилізуються на міських звалищах.

ПВ 22 Переробка відходів

У виробництві використовуються матеріали та речовини, які при правильній обробці можуть бути використані повторно. Переважно це фільтрувальні матеріали. Тканинні фільтри, що використовуються в кондиціонерах, відновлюються шляхом замочування в гарячій воді, потім очищаються і обробляються дезінфікуючими розчинами.

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		101

4.4. Матеріальний баланс

Матеріальний баланс виробництва лізату лактобактерій розрахований на 375 упаковок по 5 флаконів наведено у таблиці 4.2.

Таблиця 4.2. Матеріальний баланс виробництва

Стадія	Використано				Отримано			
	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та втрат	Кількість		
		кг	шт	л		кг	шт	л
1	2	3	4	5	6	7	8	9
ДР 6.3 Підготовка стерильного поживного середовища для виробничого біосинтезу	Калій фосфорнокислий однозаміщений	0,845			Поживне середовище			460
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,07			Втрати			9,5
	MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,023						
	Цукор-пісок	3,756						
	Ферментолізат казеїну	8,451						
	Ферментолізат борошна соєвого	3,756						
	Екстракт дріжджовий	8,451						
	Екстракт кукурудзяний	1,878						
Вода питна				442,27				
	Всього:	469,5			Всього:	469,5		
ДР 6.4 Підготовка Декстрану 70	Декстран 70	0,18			Розчин Декстран 70			0,44
	Питна вода			0,27	Втрати			0,01
	Всього:	0,45			Всього:	0,45		
ТП 8 Виробниче культивування	Поживне середовище (з ДР 6.3)			460	Культуральна рідина			500
	Посівний матеріал			50	Втрати			10

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
-----	------	----------	--------	------

ДП 6218. 00.000 ПЗ

Арк.

102

	Всього:	510			Всього:	510			
ТП 9 Відокремлення біомаси	Культуральна рідина			500	Культуральне середовище			486	
						Волога біомаса	4		
						Втрати(2%)			10
	Всього:	500			Всього:	500			
ТП 10 Лізис біомаси	Волога біомаса	4			Суспензія			23,8	
	Вода очищена			24	Супернатант			6,03	
	20% розчин NaOH			2,1					
	Хлороформ			0,04					
	Лізоцим			0,3	Втрати			0,61	
	Всього:	30,44			Всього:	30,44			
ТП 11 Центрифугування	Суспензія			23,8	Супернатант			20	
					Втрати			0,24	
					Осад			3,56	
	Всього:	23,8			Всього:	23,8			
ТП 12 Концентрування	Супернатант			20	Лізат лактобактерій			4	
					Пара			15,6	
					Втрати			0,4	
	Всього:	20			Всього:	20			
ТП 13, 14 Кислотна денатурація білків та центрифугування	Лізат лактобактерій				Супернатант			4	
				4	Осад	0,5			
	14% розчин HCL			0,5					
	Всього:	4,5			Всього:	4,5			
ТП 15 Нейтралізація та спиртоосадження	Супернатант			4	Розчин біомаси			18,55	
	Етиловий спирт			22	Спиртовий розчин			11,45	
	Вода			4					
	Всього:	30			Всього:	30			
ТП 16 Стандартизація препарату	Розчин декстрану 70			0,44	Суміш біомаси і декстрану 70 (напівпродукт)			18,99	
	Розчин біомаси			18,55					
	Всього:	18,99			Всього:	18,99			
ТП 17 Наповнення флаконів	Флакони		94	00	Наповнені продуктом флакони		94	18,8	

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 6218. 00.000 ПЗ

Арк.

103

	Напівпродукт			18,9 9	Втрати			0,19
	Всього:	9418,99			Всього:	9418,99		
ТП 18 Сублимаційн е сушіння препарату	Наповнені напівпродукт ом флакони		94 00		Наповнені продуктом флакони		94 00	
	Напівпродукт			18,8	Вода			18,23 2
					Ліофілізован а Біомаса	0,1 88		
					Втрати			0,38
	Всього:	9418,8			Всього:	9418,8		
ТП 19 Закупорюван ня флаконів	Флакони з сухим продуктом		94 00		Закупорені флакони з готовим препаратом у флаконах		94 00	
	Пробки гумові		94 00		Пробки гумові		94 00	
	Алюмінієві ковпачки		94 00		Алюмінієві ковпачки		94 00	
	Всього:	28200			Всього:	28200		
ПМВ 20 Пакування, маркування, відвантаженн я готового продукту	Закупорені флакони з готовим препаратом у флаконах		94 00		Розфасовани й та упакований готовий препарат у флаконах		94 00	
	Етикетки		94 00		Етикетки на флаконах		94 00	
	Інструкція		18 80		Інструкції в коробках		18 80	
	Блістер		18 80		Блістер в коробках		18 80	
	Коробки пакувальні		18 80		Коробки пакувальні з флаконами		18 80	
	Групова тара		94		Групова тара		94	
Всього:		22654			Всього:	22654		

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 6218. 00.000 ПЗ

Арк.

104

4.5. Контроль виробництва

Таблиця 4.5.1. Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР 1.1 Підготовка персоналу Кмб 1.1.1	Руки персоналу, Мікробіологічна чистота	Засів на поживне середовище, візуально	2 рази на тиждень	Класи чистоти, КУО: А – < 1; В – не більше 5; С – не більше 25; D – не більше 50
ДР 1.2.1 Підготовка розчину перекису водню Кх 1.2.1.1	Розчин перекису водню (концентрація)	Концентратомір	Кожну операцію	6%
ДР 1.2.2 Підготовка розчину хлоргексидину біглюконату Кх 1.2.2.1	Розчин хлоргексидину біглюконату (концентрація)	Концентратомір	Кожну операцію	0,1-0,2%
ДР 1.2.3 Підготовка мийних та мийно-дезінфікуючих розчинів Кх 1.2.3.1	Розчин мийного засобу (концентрація)	Концентратомір	Кожну операцію	0,5%
ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень Км 1.3.1	Мікробіологічна контамінація	Бактеріологічний контроль	Кожну операцію	Класи чистоти, КУО: А – < 1; В – не більше 5; С – не більше 25; D – не більше 50

ДР 1.4.1 Миття і дезінфекція обладнання та комунікацій Кт 1.4.1.1 Кмб 1.4.1.1	Температура, мікробна контамінація	Термометр, візуально	Кожну операцію	$t = 50-60^{\circ}\text{C}$
ДР 1.4.2 Перевірка обладнання на герметичність Кт 1.4.2.1	Герметичність	манометр, мильна вода	Кожну операцію	$P=0,05-0,06$ МПа $\tau=30$ хв Норма відхилення $= 0,005$ МПа
ДР 1.4.3 Стерилізація обладнання Кт 1.4.3.1 Кмб 1.4.3.1	Чистота обладнання, вміст мікроорганізмів, температура, тиск	Візуально, мікро біо логічний аналіз, термометр, манометр	Кожну операцію	$t=125-145$ $^{\circ}\text{C}$ $P=0,18-$ $0,3$ МПа $\tau=1-2$ год
ДР. 2.1.2 Попередня очистка повітря Кт 2.1.2.1	Повітря, Перепад тиску	Манометр	Протягом процесу	Стале задане значення
ДР 2.1.3 Транспортування повітря Кт 2.1.3.1	Повітря, Тиск	Манометр	Протягом процесу	0,2 МПа
	Повітря, Температура	Термометр		120 $^{\circ}\text{C}$
ДР 2.1.4 Кондиціонування повітря Кт 2.1.4.1	Повітря, Температура	Термометр	Протягом процесу	18-20 $^{\circ}\text{C}$
ДР 2.1.5 Тонка очистка повітря Кт 2.1.5.1	Повітря, Перепад тиску	Манометр	Протягом процесу	Стале задане значення
ДР 2.1.6 Високоєфективна очистка повітря Кт 2.1.6.1	Повітря, Перепад тиску	Манометр	Протягом процесу	Стале задане значення
	Повітря, Вологість	Психрометр		45 \pm 5%
	Повітря, Температура	Термометр		20 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$

ДР 2.2.2 Попереднє очищення повітря та його стиснення Кт 2.2.2.1	Повітря, Перепад тиску	Манометр	Протягом процесу	Стале задане значення
	Повітря, Температура	Термометр		150 °С
	Повітря, Тиск	Манометр		0,3 МПа
ДР 2.2.3 Охолодження повітря та згладжування коливань витрат Кт 2.2.3.1	Повітря, Температура	Термометр	Протягом процесу	37 °С
	Повітря, Вологість	Психрометр		60%
	Повітря, Тиск	Манометр		0,3 МПа
ДР 2.2.4 Очищення повітря на головному фільтрі Кт 2.2.4.1	Повітря, Перепад тиску	Манометр	Протягом процесу	Стале задане значення
ДР 2.2.5 Очищення повітря на індивідуально му фільтрі Кт 2.2.5.1	Повітря, Перепад тиску	Манометр	Протягом процесу	Стале задане значення
	Повітря, Температура	Термометр		37 °С
ДР 3.1 Підігрів і термостатува ння Кт 3.1.1	Вода у теплообмінник у, Температура	Термометр	Протягом процесу	20 °С
ДР 3.2 Грубе очищення води Кт 3.2.1	Вода у трубопровод, Тиск	Манометр	Протягом процесу	0,6±0,01 МПа
ДР 3.3 Пом'якшення води на іонообінній смолі Кт 3.3.1	Вода пом'якшена, Жорсткість води	TDS-метр	Кожну операцію	<0,01 мг- екв/л
ДР 3.4 Фільтрація	Вода у трубопровод,	Манометр	Протягом процесу	0,6 МПа

води пом'якшеної через вугільний фільтр Кт 3.4.1	Тиск			
ДР 3.5 Очищення води у системі зворотнього осмосу Кх 3.5.1 Кт 3.5.1	Вода очищена, Загальний органічний вуглець	Хімічний метод визначення концентрації	Кожну операцію	$\leq 0,5$ мг/л
	Вода очищена, Нітрати			$\leq 0,00002$ %
	Вода очищена, Важкі метали			$\leq 0,00001$ %
	Вода очищена, Витрата води	Витратомір	Протягом процесу	Стале задане значення
	Вода очищена, Пітома електропровідність	Кондуктометр	Кожну операцію	4,3 μ S/cm
ДР 3.6 Надходження води очищеної у збірник Кт 3.6.1 Кмб 3.6.1	Бактерицидні УФ-лампи, Довжина хвилі	УФ-радіометр	Протягом процесу	185 нм, 245 нм, 254 нм
	Вода очищена, Температура	Термоперетворювач		20 °C
	Вода очищена, Рівень води	Поплавковий датчик		Відповідно конструкції
	Вода очищена у трубопроводі, Тиск	Манометр		0,6 МПа
	Вода очищена, Витрата води	Витратомір		Стале задане значення
	Вода очищена, Кількість живих аеробних КУО в 1 мл	Мембранна фільтрація та висів на поживне середовище		Кожну операцію
ДР 4.1. Мийка та ополіскування тари	Температура, час	Регулятор температур, годинник	Кожен цикл	35-60 °C, 20 хв

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 6218. 00.000 ПЗ

Арк.

108

середовища для отримання посівного матеріалу Кт 6.2.1.1 Кх 6.2.5	Режим стерилізації, Тривалість	Годинник		30 хв
	Режим стерилізації, Тиск	Манометр		0,05 МПа
	Компоненти середовища, Вага компонентів	Електронні ваги	Кожну операцію	$m_{\text{комп}}$
ДР 6.2.2 Охолодження середовища для отримання посівного матеріалу Кт 6.2.2.1 Км 6.2.2.1 Кх 6.2.2.1	Тривалість охолодження	Годинник	Кожну операцію	25 хв
	Температура	Термометр		$39 \pm 1^\circ\text{C}$
	Мікробіологічна чистота середовища	Висів на чашки Петрі з МПА та інкубування, візуально		Відсутність сторонньої мікрофлори
	рН середовища	рН-метр		6,6-6,8
ДР 6.3.1 Змішування і стерилізація середовища для виробничого біосинтезу Кт 6.3.1.1 Кх 6.3.5.1	Режим стерилізації, Температура	Термометр	Протягом процесу	126-128 °C
	Режим стерилізації, Тривалість	Годинник		40 хв
	Режим стерилізації, Тиск	Манометр		0,1 МПа
	Компоненти середовища, Вага компонентів	Електронні ваги	Кожну операцію	$m_{\text{комп}}$
ДР 6.3.2 Охолодження середовища для виробничого біосинтезу Кт 6.3.2.1 Км 6.3.2.1	Тривалість охолодження	Годинник	Кожну операцію	25 хв
	Температура	Термометр		40 °C
	Мікробіологічна чистота середовища	Висів на чашки Петрі з МПА та інкубування, візуально		Відсутність сторонньої мікрофлори

ДР 6.4 Підготовка декстрану 70 Кт 6.4.1	Розчин декстрану 70, кількість декстрану 70, режим стерилізації	Мірний посуд, ваги, ваговий метод	Кожний цикл	40%, 30 хв
	Температура	Термометр		110 °С
	Режим стерилізації, Тиск	Манометр		0,05 МПа
ТП 7.1 Відновлення музейної культури Кт 7.1.1, Км 7.1.1	Кількість фізіологічного розчину	Ваги, мірний посуд	Постійно протягом процесу	1 см ³ на дозу робочої культури
	Кількість поживного середовища МРС-1	Ваги, мірний посуд		5-7 мл у пробірці
	Температура інкубування	Термометр		40±1С
	Тривалість інкубування	Годинник		24 год
	Мікробіологічн а чистота культури	Висів на чашки Петрі з МПА з 5 % глюкози і на середовище Сабура, інкубування 48- 72 год, мікроскопіюван ня	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 7.2 Отримання посівного матеріалу в колбах Кт 7.2.1, Км 7.2.1	Кількість поживного середовища МРС-1	Ваги, мірний посуд	Постійно протягом процесу	500 мл у колбі
	Температура інкубування	Термометр		40±1°С
	Тривалість інкубування	Годинник		24 год
	Мікробіологічн а чистота культури	Висів на чашки Петрі з МПА з 5 % глюкози і на середовище Сабура, інкубування 48-	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		111

		72 год, мікроскопіюван ня		
ТП 7.3 Отримання посівного матеріалу в інокуляторі Кт 7.3.1 Км 7.3.1	Мікробіологічн а чистота культури	Висів на чашки Петрі з МПА з 5 % глюкози і на середовище Сабуро, інкубування 48- 72 год, мікроскопіюван ня	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
	Кількість поживного середовища	Дозуючий пристрій, ваговий метод		46 л
	Температура інкубування	Термометр		39±1°C
	Тривалість інкубування	Годинник		8-16 годин
	Кількість життєздатних клітин	Висів на чашки Петрі з агаризованим середовищем МРС, інкубування, підрахунок живих клітин за допомогою лічильника колоній бактерій (ПСБ)		Не менше ніж 10 ⁸ КУО/см
ТП 8 Культивуванн я продуцента у ферментері Кт 8.1, Км 8.1, Кх 8.1	Кількість поживного середовища	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Кожну операцію	460 л
	Кількість мікробної суспензії Lactobacillus plantarum 8P- A3	Дозуючий пристрій, ваговий метод		50 л
	Температура	Термометр		39±1°C
	Тривалість культивування	Годинник		12 год
	pH	pH-метр		3,8-4,2

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 6218. 00.000 ПЗ

Арк.

112

	Тиск	Манометр		0,03-0,04 МПа
	Перемішування	Тахометр		200 об/хв
	Кількість життєздатних клітин <i>Lactobacillus plantarum</i> 8P-A3	Висів на чашки Петрі з середовищем МРС, інкубування, підрахунок живих клітин (ПСБ)		Не менше ніж 10^9 КУО/см
	Оптична густина	Фотоколориметр		Згідно технологією
ТП 9 Відокремлення біомаси Кт 9.1	Повнота відділення біомаси	Аналітичний	Кожну операцію	Повне відділення
ТП 10.1.1 Гідроліз розчином NaOH 20% Кт 10.1.1.1 Кх 10.1.1.1	Кількість вологої біомаси	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Кожну операцію	4 кг
	Кількість очищеної води	Дозуючий пристрій, ваговий метод		6 л
	Швидкість перемішування	Тахометр		120 об/хв
	Температура	Термометр		40-58°C
	pH	pH-метр		7,0
	Тривалість гідролізу	Годинник		5 год
	Кількість 20% розчину NaOH	Дозуючий пристрій		Згідно з технологією
ТП 10.1.2 Центрифугування Кт 10.1.2.1	Швидкість потоку	Тахометр	Постійно протягом процесу	12000 об/хв
	Тривалість центрифугування	Годинник		10 хв
	Контроль повноти центрифугування	Аналітичний		Повне відділення осаду

ТП 10.2 Нейтралізація Кт 10.2.1 Кх 10.2.1	Кількість 14% розчину HCL	Дозуючий пристрій	Кожну операцію	Згідно з технологією
	pH	pH-метр		6,0±0,1
	Швидкість перемішування	Тахометр		12000 об/хв
	Тривалість центрифугуван ня	Годинник		10 хв
ТП 10.3 Лізис розчином лізоциму Кт 10.3.1 Кх 10.3.1	Кількість клітинного матеріалу	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Кожну операцію	Згідно з технологією
	Кількість Очищеної води	Дозуючий пристрій, ваговий метод		10 л
	Кількість 20% розчину NaOH	Дозуючий пристрій		Згідно з технологією
	pH	pH-метр		7,0±1
	Кількість хлороформа	Дозуючий пристрій		40 мл
	Кількість лізоциму	Дозуючий пристрій		300 мл
	Оптична густина	Фотоколоримет р		450 нм
	Швидкість перемішування	Тахометр		200 об/хв
	Тривалість	Годинник		2-10 год
	Температура	Термометр		38±1°C
ТП 11 Центрифугува ння Кт 11.1	Швидкість перемішування	Тахометр	Постійно протягом процесу	20 000 об/хв
	Тривалість центрифугуван ня	Годинник		10 хв
	Контроль повноти центрифугуван ня	Аналітичний		Повне відділення осаду
ТП 12 Концентруван ня Кт 12.1 Кх 12.1	Температура	Термометр	Кожну операцію	40°C
	Ступінь концентрації розчину	Хімічний		5 разів до 4 л
	Тиск	Вакуумметр		10 ⁵ Па

ТП 13 Кислотна денатурація білків Кх 13.1	Кількість 14% розчину HCL	Дозуючий пристрій	Кожну операцію	Згідно з технологією
	pH	pH-метр		3,0
ТП 14 Центрифугування Кт 14.1	Швидкість перемішування	Тахометр	Постійно протягом процесу	10 000 об/хв
	Тривалість центрифугування	Годинник		10 хв
	Контроль повноти центрифугування	Аналітичний		Повне відділення осаду
ТП 15 Нейтралізація та спиртоосадження Кт 15.1 Кх 15.1	Кількість 20% розчину NaOH	Дозуючий пристрій	Кожну операцію	Згідно з технологією
	pH	pH-метр		7,0±0,1
	Кількість етилового спирту	Дозуючий пристрій, ваговий метод		Згідно з технологією
	Тривалість спиртоосадження	Годинник		12 год
	Кількість очищеної води	Дозуючий пристрій, ваговий метод		4 л
	Температура	Термометр		21±2°C
ТП 16 Стандартизація препарату Кт 16.1 Кх 16.1 Км 16.1	Кількість Декстрану 70	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Кожну операцію	Згідно з технологією
	Швидкість перемішування	Тахометр		200 об/хв
	Тривалість перемішування	Годинник		10-15 хв
	Кількість 5% розчину NaOH	Дозуючий пристрій		Згідно з технологією
	pH	pH-метр		7,0±0,2
	Мікробіологічна чистота культури	Шляхом висіву		Відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 17	Наповнення	Автоматично	Кожну	По 2 мл

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
-----	------	----------	--------	------

ДП 6218. 00.000 ПЗ

Арк.

115

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Інокулятор для вирощування мікробного посівного матеріалу з використанням рідких поживних середовищ є найбільш специфічним обладнанням для біотехнологічного виробництва. Основними вимогами до таких пристроїв є забезпечення заданої концентрації розчиненого кисню в поживному середовищі, видалення вуглекислого газу, створення рівномірно концентраційного поля компонентів поживного середовища, а також забезпечення процесів тепло- і масообміну, необхідних для росту і розвитку мікроорганізмів.

Існує безліч типів інокуляторів для культивування мікроорганізмів, але всі конструкції в основному схожі за більшістю параметрів і в середньому можуть бути розділені на два типи: без подачі стерильного повітря (для анаеробних бактерій) і з подачею повітря (для аеробних бактерій).

Залежно від способу подачі енергії для перемішування розрізняють:

- Інокулятор з подачею енергії газової фази (барботажні, ерліфтні, тарілчасті);

- Інокулятор, які можуть подавати комбіноване введення

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Томілко К.О.</i>			<i>Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Консульт.</i>						<i>Д</i>	<i>117</i>	<i>152</i>
<i>Керівник</i>		<i>Яловенко О.І.</i>			<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ</i>			
<i>Затвер.</i>								

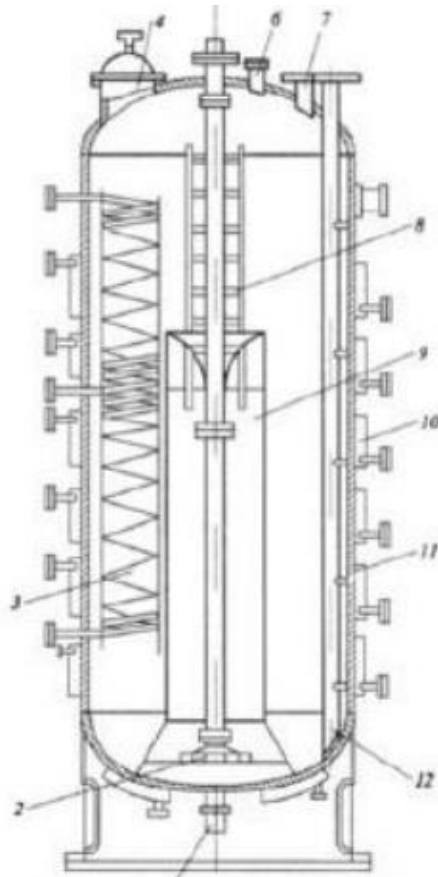


Рисунок 5.1 – Схема інокулятора з ерліфтом [80]

1 – штуцер для вивантаження посівного матеріалу, 2 – аератор, 3 – внутрішній змійовик, 4 – люк, 5 – штуцер для подачі повітря, 6 – штуцер для відведення повітря, 7 – штуцер для завантаження, 8 – драбина, 9 – дифузор, 10 – секційна сорочка, 11 – корпус, 12 – труба перетискання.

У фармацевтичному виробництві широко використовуються інокулятори з самовсмоктуючими мішалками (рис. 5.2). Такі інокулятори являють собою вертикальні циліндричні апарати, оснащені циркуляційним пристроєм, теплообмінним пристроєм і аеруючим. Циркуляційний пристрій являє собою систему направляючих дифузорів, що розділяють висхідний і низхідний потоки. Теплообмінний пристрій виконаний у вигляді трубок, встановлених в трубних решітках дифузорів[81].

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		119

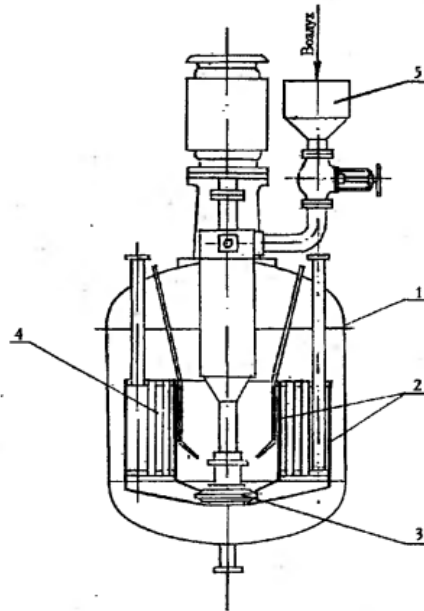


Рисунок 5.2. Схема інокулятора із самовсмоктуючою мішалкою [81]

1 - корпус, 2 - дифузор, 3 - самовсмоктуюча мішалка. 4 - теплообмінник, 5 - фільтр.

Оскільки продуцент *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 належить до факультативно-анаеробної групи, використання наведеної вище конструкції із самовсмоктуючою мішалкою і інокулятора з ерліфтом не є доцільним через наявність пристрою аерації.

Інокулятор з механічним перемішуванням, а також без подачі аераційного повітря є найбільш підходящим для використання у виробництві лізату лактобактерій. Він має механічну мішалку, що складається з центрального валу і лопатей різної форми. Система змішування також має відбивні перегородки, які являють собою тонкі металеві пластини, прикріплені до внутрішніх стінок посівного апарату для підвищення ефективності перемішування.

Розглянемо основні типи, що використовуються в біотехнологічній промисловості для того, щоб вибрати найкращий механічний перемішувач.

Застосування в біотехнологічній промисловості

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		120

1. Для перемішування суспензій, розчинів і хімічних реакцій рекомендуються **лопатеві мішалки**. Такі мішалки застосовуються, коли немає необхідності в інтенсивній радіально-осьовій циркуляції рідини в обладнанні. Тому, що вони хоч і прості за конструкцією, але працюють недостатньо інтенсивно. Як правило, лопатеві мішалки мають дві лопаті та низькі оберти.

2. Коли є необхідність у більш інтенсивному перемішуванні по висоті, а також для перемішування в'язких рідин у великих об'ємах, використовуються **рамні мішалки**.

3. **Якірні мішалки** слід використовувати для перемішування в'язких рідин, щоб збільшити теплообмін і запобігти відкладенню осаду на стінках і дні обладнання.

4. **Мішалки турбінного типу** слід використовувати, коли потрібне інтенсивне перемішування для диспергування газів у рідинах, особливо для рідин з широким діапазоном в'язкості. Вони також використовуються для розчинення твердих кристалічних частинок і для емульгування рідин з великою різницею в щільності. Закрита турбінна мішалка – це апарат в якому лопаті, що перемішують, розташовані в корпусі, утворюючи закриті канали, подібно до ротора центробіжного насоса. У відкритих змішувачах лопаті не розташовані в корпусі. Найпростішим і найефективнішим типом відкритої турбінної мішалки є мішалка з прямими лопатями, розташованими в радіально.

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		121

Серед усіх механічних змішувальних пристроїв турбінні мішалки характеризуються найвищою швидкістю обертання ($0...22,5 \text{ с}^{-1}$). Ще однією перевагою цього типу змішувачів є те, що вони легші та дешевші, ніж рамні або лопатеві мішалки. Тому, враховуючи всі корисні параметри, найбільш підходящим варіантом є встановлення відкритої турбінної мішалки (рис.5.3) [82, 83].

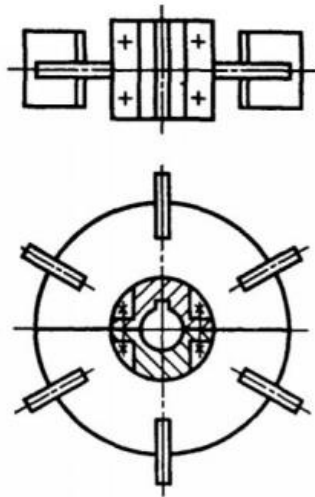


Рисунок 5.3. Турбінна мішалка [83]

Вибір оптимальної конструкції

Так як, ріст досліджуваного продуцента *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 відбувається в анаеробних умовах, то подача повітря не потрібна, а посівний апарат виробничого процесу виглядає наступним чином (рис. 5.4):

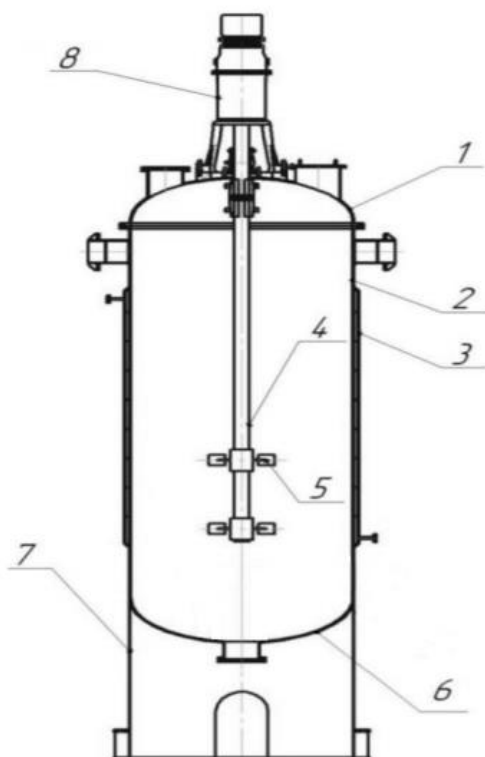


Рисунок 5.4. Схематичне зображення посівного апарату [82] 1 – кришка; 2 – корпус; 3 – сорочка; 4 – вал; 5 – перемішуючий пристрій; 6 – днище; 7 – опора, 8 – привід

Пристрій складається з корпусу 2, овального днища 6 і знімної кришки 1. Всередині розташований змішувальний пристрій, який являє собою відкриту турбінну мішалку 5, яка розташована в два яруси і закріплена на валу 4. При культивуванні продуценту в сорочку інокулятора 3 необхідно подавати гарячу воду температурою 42°C для підтримання температури середовища на рівні $(39 \pm 1)^\circ\text{C}$. Теплообмінна сорочка має верхній штуцер для подачі теплоносія і нижній штуцер для відводу відпрацьованої теплоносія. Інокулянт оснащений термогільзою з датчиком контролю температури, датчиком рН і манометром.

Принцип роботи полягає в тому, що поживне середовище та однодобову посівну культуру *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 завантажуються в пристрій для отримання посівного матеріалу. Для перемішування біомаси в інокулятор кріпиться вал з турбінною мішалкою.

Така конструкція відповідає вимогам і забезпечує оптимальні технологічні умови для вирощування посівного матеріалу[82].

До конструкції інокулятора висуваються такі основні вимоги стосовно герметичності. Ущільнення зварного шва повинно бути щільним. Зварний шов повинен бути герметичним. Не допускається накопичення вологи у зварних швах під час гідравлічних випробувань, оскільки це може призвести до потрапляння сторонньої мікрофлори у культуральне середовище. Сальник робочого валу машини, ущільнення люка і фланцеві з'єднання також повинні бути герметичними. Для забезпечення герметичності обладнання з механічними мішалками використовують прокладки, особливо подвійні торцеві, які запобігають втраті робочого середовища з обладнання і перешкоджають потраплянню повітря всередину конструкції.

Матеріали конструктивних елементів пристрою повинні забезпечувати міцність і стійкість цих елементів. Матеріали елементів пристрою, поверхні яких контактують з робочим середовищем (мішалка, вал, корпус, днище та кришка), повинні бути хімічно інертними, нетоксичними для робочого середовища, стійкими до корозії та здатними витримувати дезінфекційну обробку та стерилізацію [83].

Враховуючи призначення даної конструкції та необхідність дотримання вимог GMP, внутрішня поверхня пристрою, що контактує з культивованою біомасою лактобактерій, була виготовлена з медичної нержавіючої сталі AISI 316L, просоченої молібденом, а сорочка та облицювання із сталі - з AISI 304L (08x18x10).

Для запобігання потраплянню інфекції під час вирощування посівного матеріалу, надлишковий тиск під кришкою пристрою повинен становити 0,3 МПа [80].

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		124

Технічна характеристика вибраної конструкції посівного апарату

1. Апарат призначено для вирошування посівного матеріалу *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 для виробництва лізату лактобактерій.

2. Номінальний об'єм – 0,1 м³

3. Робочий об'єм - 0,05 м³

4. Тип перемішуючого пристрою - мішалка відкрита турбінна шестилопатева.

5. Кількість мішалок - 1.

6. Кількість відбивних перегородок - 0.

7. Частота обертання вала мішалки - 1 с⁻¹.

8. Потужність електродвигуна - 0,12 кВт.

9. Габаритні розміри:

- ширина 550 мм;

- довжина 665 мм;

- висота 1350 мм.

10. Маса 185 кг

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		125

5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Конструктивний розрахунок посівного апарату

Метою конструктивного розрахунку є визначення розмірів посівного апарату та основних конструктивних елементів.

Вихідні дані:

Загальний об'єм апарату

$$V_H = 0,1 \text{ м}^3$$

Робочий об'єм апарату

$$V_p = 0,05 \text{ м}^3$$

Коефіцієнт заповнення

$$K_3 = 0,5$$

Коефіцієнт динамічної в'язкості

$$\mu = 1,55 \cdot 10^{-3} \text{ Па}\cdot\text{с}$$

Густина середовища в реакторі

$$\rho = 1060 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3}$$

Тип перемішуючого пристрою відкрита турбінна шестилопатева мішалка

Кількість мішалок

$$m = 1$$

Частота обертання валу мішалки

$$n = 1 \text{ с}^{-1}$$

Для отримання посівного матеріалу *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 було обрано апарат з еліптичним днищем і еліптичною знімною кришкою (тип 0). За ГОСТ 20680–86 приймаємо внутрішній діаметр апарату [84]:

$$D_{\text{вн}} = 500 \text{ мм} = 0,5 \text{ м}$$

Розрахуємо розміри днища апарату. Висота еліптичної частини днища:

$$h_{\text{ел.дн}} = 0,25 \cdot D_{\text{вн}};$$

$$h_{\text{ел.дн}} = 0,25 \cdot 500 = 125 \text{ мм} = 0,125 \text{ м}.$$

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		126

Оскільки еліптичні днища є стандартними виробами, то за ГОСТ 6533–78 знаходимо решту конструктивних розмірів днища посівного апарату [85]:

внутрішня поверхня еліптичного днища : $F=0,31\text{м}^2$

висота відбортованої частини: $h_1=25\text{мм}=0,025\text{м}$

товщина стінки еліптичного днища : $S_{\text{дн}}=5\text{мм}=0,005\text{м}$

об'єм еліптичного днища : $V_{\text{дн}}=21,2\text{ дм}^3=0,0212\text{ м}^3$

маса днища : $m_{\text{дн}}=12,5\text{кг}$

Повна висота еліптичного днища: $H_{\text{дн}}=0,025+0,125=0,15\text{ м}$

Повний об'єм:

$$V = V_{\text{ц}} + 2V_{\text{дн}} \Rightarrow V_{\text{ц}} = V - 2V_{\text{дн}}$$

звідки об'єм циліндричної частини реактора:

$$V_{\text{ц}} = 0,1 - 2 \cdot 0,0212 = 0,0576\text{ м}^3$$

Висоту циліндричної частини реактора обираємо зі стандартних габаритних типорозмірів у відповідності до внутрішнього діаметру посівного апарату:

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F} = \frac{V_{\text{ц}} \cdot 4}{\pi \cdot D_{\text{РН}}^2} = \frac{0,0576 \cdot 4}{3,14 \cdot 0,5^2} = 0,3\text{ м}$$

Висота рівня рідкого поживного середовища в циліндричній частині апарату:

$$H_{\text{рц}} = \frac{4(V_{\text{р}} - V_{\text{дн}})}{\pi \cdot D_{\text{РН}}^2} = \frac{4(0,05 - 0,0212)}{3,14 \cdot 0,5^2} = 0,15\text{ м}$$

Висота стовпа рідини в реакторі:

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		127

$$H_p = H_{pc} + H_{дн} = 0,15 + 0,15 = 0,3 \text{ м}$$

Загальна висота реактору без штуцерів та опор:

$$H_{заг} = H_c + 2 \cdot H_{дн} = 0,3 + 2 \cdot 0,15 = 0,6 \text{ м}$$

Розрахунок перемішуючого пристрою посівного апарату

В якості пристрою для перемішування в інокуляторі знаходяться турбінні шестилопатеві мішалки, схема яких зображена на рисунку 5.5.

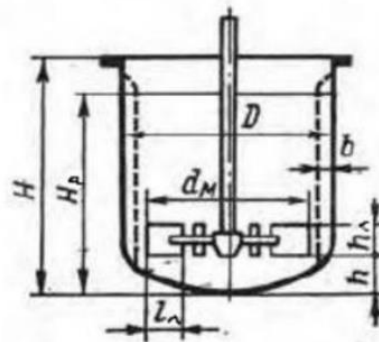


Рисунок 5.5.Схема апарату з турбінною мішалкою [86]

Діаметр турбінної мішалки визначаємо за ГОСТ 20680-86 [84]:

$$d_M = 160 \text{ мм}; \frac{D_{BH}}{d_M} = 3,125$$

Розрахуємо розміри мішалки:

висота лопаті:

$$h_l = 0,2 \cdot d_M = 0,2 \cdot 0,16 = 0,032 \text{ м}$$

Ширина лопаті:

$$l_l = 0,25 \cdot d_M = 0,25 \cdot 0,16 = 0,04 \text{ м}$$

Висота від днища до мішалки:

$$h = 0,5 \cdot d_M = 0,5 \cdot 0,16 = 0,08 \text{ м}$$

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Эм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		128

Коефіцієнт гідравлічного опору мішалки: $\xi_m = 8,4$.

Колова швидкість для турбінної мішалки: $w = (2,5 \dots 10)$ м/с, приймаємо 6 м/с.

Частота обертання:

$$n = w / \pi d_m = 6 / 3,14 \cdot 0,16 = 1 \text{ с}^{-1}$$

Для визначення необхідності встановлення відбиваючих перегородок розрахуємо глибину воронки. Критерій Рейнольдса [86]:

$$Re_{вц} = \frac{n \cdot d_m^2 \cdot \rho_c}{\mu_c} = \frac{1 \cdot 0,16^2 \cdot 1060}{1,55 \cdot 10^{-3}} = 1,75 \cdot 10^4$$

де ρ_c – густина поживного середовища в інокуляторі, кг/м³; μ_c – коефіцієнт динамічної в'язкості, Па·с.

Параметр Γ [83]:

$$\gamma(\Gamma) = \frac{8 \cdot H_p}{D_{вн}} + 1 = \frac{8 \cdot 0,3}{0,5} + 1 = 5,8$$

де H_p – висота стовпа рідини в апараті; D – діаметр апарату.

Параметр гідравлічного опору мішалки E :

$$E = \frac{\gamma}{\xi_m \cdot z \cdot Re_{вц}^{0,25}} = \frac{5,8}{8,4 \cdot 1 \cdot (1,75 \cdot 10^4)^{0,25}} = 0,007$$

Де ξ_m – критерій опору; z – кількість мішалок на валу (2) шт.

Глибина воронки в посівному апараті без відбиваючих перегородок [86]:

$$h_b = \frac{B \cdot n^2 \cdot d_m^2}{2} = \frac{2 \cdot 1^2 \cdot 0,16^2}{2} = 0,28 \text{ м}$$

де B – параметр, значення якого визначається з номограми [86] в залежності від E і типу мішалки

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		129

Гранично допустима глибина воронки:

$$h_{\text{доп}} = H_p - h = 0,3 - 0,08 = 0,22 \text{ м}$$

Як видно з розрахунків, відношення $h_B < h_{2p}$ виконується, а отже, ферментер не потребує встановлення внутрішніх відбійних перегородок [86].

Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування

Потужність, що витрачається на перемішування визначають за формулою [86]:

$$N = K_N \cdot \rho_c \cdot n^3 \cdot d_M^5$$

де – критерій потужності, що залежить від інтенсивності перемішування і характеризується центробіжним критерієм Рейнольдса.

За графіком нормалі (рисунок 5.6) знаходимо значення для апарату без перегородок зі співвідношенням діаметру апарату до діаметру мішалки

$$- \Gamma_D = \frac{D_{\text{вн}}}{d_M} = \frac{500}{160} = 3,1.$$

Значення $K_N = 7$.

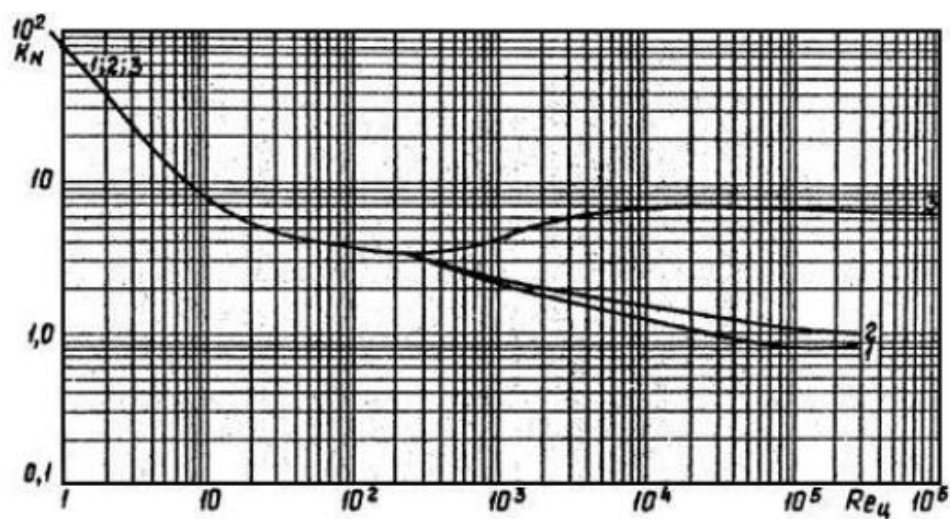


Рисунок 5.6. Число для апаратів з турбінними мішалками [86];

1 - в апараті без перегородок, ГД=3; 2 - в апараті без перегородок, ГД=4; 3 - в апараті з перегородками, ГД=3-4.

$$N = 7 \cdot 1060 \cdot 1^3 \cdot 0,16^5 = 0,78 \text{ (Вт)}$$

При розрахунку потужності привода мішалки необхідно врахувати потужність, що витрачається в ущільненні валу мішалки та на подолання опору внутрішніх пристроїв інокулятора Потужність, що витрачається на тертя в ущільненнях вала мішалки залежить від діаметра вала d_v в місці ущільнення. Для вибору торцевого ущільнення визначимо діаметр валу.

Значення d_v можна розрахувати за допомогою наближеного співвідношення [86]

$$d_v = C \cdot d_m = 0,117 \cdot 0,16 = 0,019 \text{ м}$$

де коефіцієнт C вибирається в залежності від конструкції мішалки.

Оскільки торцеве ущільнення має високу герметичність у порівнянні з аналогами, високий ККД, високу зносостійкість, довговічність, добре працює при присутності биття валу, тому обираємо його до конструкції посівного апарату. Обираємо тип ущільнення подвійне з термічним затвором Т1 (ТТ) – для валів апаратів зі стерильними біологічними процесами.

Потужність приводу перемішуючого пристрою розраховується за формулою [83]

$$N_{\text{ел}} = \frac{K_n \cdot K_H \cdot \sum K_i \cdot N + N_{\text{ущ}}}{\eta}$$

де коефіцієнт рівня рідини в апараті:

$$K_H = \left(\frac{H_p}{D}\right)^{0,5} = \left(\frac{0,3}{0,5}\right)^{0,5} = 0,77$$

K_n – коефіцієнт, що вказує на відсутність в апараті відбиваючих перегородок (1,25);

K_i – коефіцієнт, що враховує наявність в апараті внутрішніх пристроїв

$$(\sum K_i = 1,1(\text{термометр}) + 1,1(\text{манометр}) = 2,2);$$

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		131

N – потужність, що витрачається на перемішування; $N_{уц}$ – потужність, що витрачається на подолання тертя ущільнення валу мішалки; η – ККД двигуна (0,85..0,9).

Потужність, що витрачається на подолання тертя в торцевому ущільненні розраховують по формулі:

$$N_{уц} = 10440 \cdot d_B^{1,3} = 10440 \cdot 0,019^{1,3} = 60,41 \text{ Вт}$$

Отже, потужність приводу перемішуючого пристрою:

$$N_{ел} = \frac{1,25 \cdot 0,77 \cdot 2,2 \cdot 0,78 + 60,41}{0,85} = 73 \text{ Вт}$$

За знайденим за формулою значенням обираємо привід типу МРВ з $N_{ел} = 0,12$ кВт та $n=25$.

Вибір штуцерів та опор

За АТК 24.218.06-90 обираємо штуцера: для зручності з'єднання з трубопроводами приймаємо довжини вильоту рівними 80 мм. Діаметри штуцерів: штуцер для входу і виходу води, входу поживного середовища ($D_y = 50$ мм); штуцер технологічний ($D_y = 80$ мм); штуцер для входу посівного матеріалу та запасний ($D_y = 80$ мм); штуцер для виходу посівного матеріалу ($D_y = 80$ мм); штуцер для гільзи термометру, манометру та рН-метру ($D_y = M25 \times 15$ мм). Приймаємо товщину стінок всіх штуцерів рівною 2 мм. Згідно ОН 26-01-33-66 приймаємо опори для вертикальних сталевих емальованих апаратів за $D_B = 500$ мм.

Тепловий розрахунок посівного апарату

Теплообмінні пристрої посівного апарату повинні забезпечувати підтримку заданої температури протягом всього циклу. Метою теплового розрахунку є визначення теплового навантаження інокулятора і поверхні теплообміну теплообмінних пристроїв апарату.

В процесах нагрівання (охолодження) середовища в посівних апаратах тепла енергія підводиться (відводиться) теплоносієм, що поступає в теплообмінні пристрої апарата: сорочку або (та) змійовик.

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		132

Теплота, що підводиться до середовища в апараті (нагрівання) або відводиться від нього (охолодження) визначається з рівняння теплового балансу. Розрахунок ведемо за надходженнями та витратами теплової енергії.

Об'єм посівного матеріалу, що вноситься в ферментер $V_{\text{пм}} = 0,0005 \text{ м}^3$, об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}} = 0,0495 \text{ м}^3$.

Теплофізичні властивості поживного середовища при визначальній температурі – $t_{\text{ср}} = 20^\circ\text{C}$.

$$\rho_{\text{кр}} = \rho_{\text{пс}} = \rho_{\text{пм}} = 1060 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3}$$

$$C_{\text{кр}} = C_{\text{пс}} = C_{\text{пм}} = 4,073 - 0,00134 \cdot (14,4 \cdot x - t_{\text{ср1}})$$

$$C_{\text{кр}} = C_{\text{пс}} = C_{\text{пм}} = 4,073 - 0,00134 \cdot (14,4 \cdot 17 - 25) = 3,788 \cdot 10^3 \frac{\text{Дж}}{\text{кг} \cdot \text{К}}$$

Розрахунок маси поживного середовища, посівного матеріалу та культуральної рідини:

$$M_{\text{пс}} = \rho_{\text{пс}} \cdot V_{\text{пс}} = 1060 \cdot 0,0495 = 52,47 \text{ кг}$$

$$M_{\text{пм}} = \rho_{\text{пм}} \cdot V_{\text{пм}} = 1060 \cdot 0,0005 = 0,53 \text{ кг}$$

$$M_{\text{кр}} = \rho_{\text{кр}} \cdot V_{\text{кр}} = 1060 \cdot 0,05 = 53 \text{ кг}$$

Надходження енергії в інокулятор для вирощування посівного матеріалу відбувається [80]:

1) з поживним середовищем:

$$E_{\text{пс}} = M_{\text{пс}} \cdot C_{\text{пс}} \cdot t_{\text{пс}} = 52,47 \cdot 3,788 \cdot 10^3 \cdot 20 = 3,98 \text{ МДж}$$

2) з посівним матеріалом:

$$E_{\text{пм}} = M_{\text{пм}} \cdot C_{\text{пм}} \cdot t_{\text{пм}} = 0,53 \cdot 3,788 \cdot 10^3 \cdot 20 = 0,04 \text{ МДж}$$

3) теплота, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішуючих пристроїв:

$$E_{\text{дис1}} = N_{\text{усп}} \cdot \tau_{\text{пер}} = 4,1 \cdot 86400 = 0,35 \text{ МДж}$$

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		133

4) теплота реакції в процесі вирощування посівного матеріалу: в поживному середовищі міститься близько 0,8% цукру у вигляді цукор-піска:

$$m_{\text{цук}} = 0,008 \cdot M_{\text{пс}} = 0,008 \cdot 52,47 = 0,42 \text{ кг}$$

$$E_p = \frac{m_{\text{цук}} \cdot r_{\text{цук}}}{\tau_{\text{пр}}}$$

де теплота згорання цукрів 2816 кДж/моль

Таким чином:

$$E_p = \frac{0,42 \cdot 2816000}{86400} = 0,000014 \text{ МДж}$$

Сумарна кількість надходження теплоти в інокулятор:

$$\begin{aligned} \Sigma E_{\text{надх}} &= E_{\text{пс}} + E_{\text{пм}} + E_{\text{дис}_1} + E_p = 3,98 + 0,04 + 0,35 + 0,000014 \\ &= 3,37 \text{ МДж} \end{aligned}$$

Витрати теплової енергії здійснюються [80]:

1) з культуральною рідиною:

$$E_k = M_k \cdot C_k \cdot t_k = \rho_k \cdot V_p \cdot C_k \cdot t_k$$

де $t_k = 39^\circ\text{C}$ – температура культуральної рідини,

$C_k = 4070 \text{ Дж/кг} \cdot \text{K}^{-1}$ – питома теплоємність культуральної рідини,

$\rho_k = 1060 \text{ кг/м}^3$ – густина культуральної рідини,

$$E_k = 1060 \cdot 0,05 \cdot 4070 \cdot 39 = 8,41 \text{ МДж}$$

2) втрати теплоти в навколишнє середовище при нагріванні

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot E_k = 0,02 \cdot 8,41 = 0,17 \text{ МДж}$$

Сумарні витрати становлять:

$$\Sigma E_{\text{витрат}} = E_k + E_{\text{втр}} = 8,41 + 0,17 = 8,58 \text{ МДж}$$

Таким чином теплове навантаження у ферментері становить:

$$E_m = \Sigma E_{\text{витрат}} - \Sigma E_{\text{надх}} = 8,68 - 3,37 = 5,21 \text{ МДж}$$

Тобто у систему необхідно підводити тепло [80].

$$Q = |E_T| = 5,21 \text{ МДж}$$

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		134

$$Q = M_T \cdot C_T \cdot (t_{\text{ТП}} - t_{\text{ТК}})$$

Звідки:

$$M_T = \frac{Q}{C_T \cdot (t_{\text{ТП}} - t_{\text{ТК}})}$$

Де $C_T = 4182 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$ – питома теплоємність теплоносія,

$\Delta t_T = 4^\circ\text{C}$ – різниця між початковою та кінцевою температурами теплоносія,

$$M_T = \frac{5,21 \cdot 10^6}{4182 \cdot 4} = 311,45 \text{ кг}$$

Масові витрати теплоносія:

$$G_m = \frac{M_m}{\tau_{\text{пр}}} = \frac{311,45}{86400} = 0,0036 \frac{\text{кг}}{\text{с}}$$

Приймаємо до конструкції наступні параметри:

$\delta_{\text{ст}} = 0,01 \text{ м}$ – товщина стінки,

$D_c = 0,55 \text{ м}$ – діаметр сорочки інокулятора.

Певні розміри відносно діаметрів ферментера [80]:

$a = 0,03 \text{ м}; b = 0,25 \text{ м}$.

Еквівалентний діаметр:

$$d_{\text{екв}} = \frac{4ab}{2(a+b)} = \frac{4 \cdot 0,03 \cdot 0,25}{2 \cdot (0,03 + 0,25)} = 0,0536 \text{ м}$$

Середній діаметр ферментера:

$$D_{\text{ср}} = D_c - a = 0,55 - 0,03 = 0,52 \text{ м}$$

Для визначення поверхні теплообміну знаходимо коефіцієнти тепловіддачі від теплоносія у сорочці та від поживного середовища у посівному апараті і коефіцієнт теплопередачі.

Проводимо розрахунок коефіцієнту тепловіддачі від середовища до стінки. Для цього визначаємо критерій Нуссельта з критеріального рівняння [87]:

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		135

$$Nu_c = 1,35 Re_c^{0,59} \cdot Pr_c^{0,38} \cdot Fr_c^{0,1} \left(\frac{\mu_c}{\mu_{ст}} \right)^{0,14}$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_c = \frac{\rho_c \cdot n \cdot d_M^2}{\mu_c} = \frac{1060 \cdot 1 \cdot 0,16^2}{1,55 \cdot 10^{-3}} = 1,75 \cdot 10^4$$

Критерій Прандтля:

$$Pr_c = \frac{\mu_c \cdot C_c}{\lambda_c} = \frac{1,55 \cdot 10^{-3} \cdot 3788}{0,521} = 11,27$$

Критерій Фруда:

$$Fr_c = \frac{d_M \cdot n^2}{g} = \frac{0,16 \cdot 1^2}{9,81} = 0,016$$

$$Nu_c = 1,35 \cdot (1,75 \cdot 10^4)^{0,59} \cdot 11,27^{0,38} \cdot 1 \cdot 0,016^{0,1} = 714,17$$

Коефіцієнт тепловіддачі від культуральної рідини у ферментері становить:

$$\alpha_c = \frac{Nu_c \lambda_c}{D} = \frac{714,17 \cdot 0,521}{0,5} = 744,17 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

Теплофізичні властивості теплоносія [87]:

$$\rho_T = 992,4 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3}$$

$$C_T = 4182 \frac{\text{кДж}}{\text{кг} \cdot \text{К}}$$

$$\lambda_T = 0,6514 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}}$$

$$\nu_T = 0,661 \cdot 10^{-6} \frac{\text{м}^2}{\text{с}}$$

$$\mu_T = 0,656 \cdot 10^{-3} \text{Па} \cdot \text{с}$$

Критерій Нуссельта розраховуємо за формулою:

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Эм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		136

$$Nu_T = 0,008 \cdot Re_T^{0,9} \cdot Pr_T^{0,43} = 0,008 \cdot 38,98^{0,9} \cdot 4,21^{0,43} = 0,4$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_T = \frac{W_T \cdot d_{\text{екв}}}{\vartheta_T}$$

Відповідно для знаходження критерію Рейнольдса розрахуємо швидкість теплоносія:

$$W_T = \frac{V_T}{a \cdot b} = \frac{3,63 \cdot 10^{-6}}{0,03 \cdot 0,25} = 0,00048 \frac{\text{м}}{\text{с}}$$

Об'ємні витрати теплоносія:

$$V_T = \frac{G_T}{\rho_T} = \frac{0,0036}{992,4} = 3,63 \cdot 10^{-6} \frac{\text{м}^3}{\text{с}}$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_T = \frac{0,00048 \cdot 0,0536}{0,661 \cdot 10^{-6}} = 38,98$$

Критерій Прандтля:

$$Pr_T = \frac{\mu_T \cdot C_T}{\lambda_T} = \frac{0,656 \cdot 10^{-3} \cdot 4182}{0,656} = 4,21$$

Коефіцієнт тепловіддачі теплоносія в сорочці визначають за наступною формулою [87]:

$$\alpha_T = \alpha_{T1} \left(1 + 3,54 \frac{d_{\text{екв}}}{D_{\text{ср}}} \right)$$

α_{T1} визначаємо з формули:

$$\alpha_{T1} = \frac{Nu_T \cdot \lambda_T}{d_{\text{екв}}} = \frac{0,6514 \cdot 0,4}{0,0536} = 4,87 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		137

$$\alpha_T = 4,87 \cdot \left(1 + 3,45 \frac{0,0536}{0,52}\right) = 6,6 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

Коефіцієнт теплопередачі становить [81]:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_c} + \frac{\delta_{ст}}{\lambda_{ст}} + \frac{1}{\alpha_T}}$$

де $\lambda_{ст} = 17 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}}$ – теплопровідність стінки,

$$K = \frac{1}{\frac{1}{744,17} + \frac{0,01}{17} + \frac{1}{6,6}} = 13,25 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

Розрахункова поверхня теплообміну [80]:

$$F_p = \frac{Q}{K \cdot \Delta t_{cp} \cdot \tau_{пр}}$$

$$\Delta t_{\delta} = 42 - 39 = 3^{\circ}\text{C}$$

$$\Delta t_{\text{м}} = 40 - 39 = 1^{\circ}\text{C}$$

$$\Delta t_{cp} = \frac{\Delta t_{\delta} - \Delta t_{\text{м}}}{\ln \frac{\Delta t_{\delta}}{\Delta t_{\text{м}}}} = 1,821^{\circ}\text{C}$$

$$F_p = \frac{5,21 \cdot 10^6}{13,25 \cdot 1,821 \cdot 86400} = 2,5 \text{ м}^2$$

Розрахована площа теплообміну має бути меншою за дійсну площу, яку забезпечує даний теплообмінник.

$$F_p < F_d$$

За ГОСТ 9931-85 допустима площа за заданого об'єму та діаметру є рівною $3,71 \text{ м}^2$.

Умова теплообміну виконується, оскільки:

$$2,5 < 3,71 \text{ м}^2$$

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Эм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		138

5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

Насоси використовуються для автоматичної подачі живильного розчину і підтримки постійного потоку рідини в посівному апараті. Для забезпечення необхідної швидкості потоку можна використовувати відцентрові, горизонтальні або консольні насоси ЦНБК 100/40 із закритим колесом закритого типу. Максимальна продуктивність таких насосів становить 100 м³/год, що дозволяє регулювати витрату рідини у виробництві в широкому діапазоні. В даний час високим попитом користуються одноступінчасті консольні насоси АК, придатні для перекачування поживних середовищ МРС-1 до інокуляторів. Загальні технічні характеристики насосів АЦКМ 50-32-125/142/2: подача - до 6 м³/год; напір - до 5,2 м; температура перекачування - від 10 до +140 °С; температура середовища - до 40 °С. Конструктивні дані - одноступінчатий насос з горизонтальним розташуванням вала, осьовим всмоктувальним і радіальним напірним патрубком, торцевим ущільненням, електродвигун і вал насоса з'єднані еластичною муфтою, насос і електродвигун змонтовані на загальній сталевій рамі. Відцентрові насоси цієї серії виготовлені з нержавіючої сталі AISI 304.

Щоб ізолювати посівний матеріал від можливого мікробного забруднення з навколишнього середовища, посівний матеріал подається в інокулятор за допомогою перистальтичного насоса. Ці насоси не мають клапанів, поршнів, статорів або обертових елементів, що робить їх простими в експлуатації та обслуговуванні. Ми обрали насос ПТ-05 з продуктивністю 3,4 л/год [88].

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		139

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Обладнання зі змішувальними пристроями повинно відповідати вимогам ГОСТ 12.2.003-91, ГОСТ 12.2.007.9-93 та конструкторської документації на таке обладнання для забезпечення безпечної експлуатації. Для забезпечення відповідності вищезазначеним вимогам проєктоване обладнання має захист від високого тиску робочого середовища шляхом встановлення запобіжних клапанів. Герметичність обладнання до зовнішнього середовища забезпечується установкою сальникових ущільнень, надійним підведенням електроенергії та монтажем обладнання відповідно до ГОСТ 24444-87. Для захисту від електричного струму з небезпечними значеннями пристрій повинен бути обладнаний захисним заземленням згідно з ГОСТ 12.1.038-82 [89,90].

Пристрій заземлення, призначений для захисту обладнання від статичної електрики, повинен використовуватися спільно з пристроєм заземлення електрообладнання. Якщо пристрій встановлюється у виробничому приміщенні, температура зовнішньої поверхні пристрою або ізолюваного кожуха, до якої можна доторкнутися з робочої зони оператора, не повинна перевищувати 45°C. Відповідно до вимог, рівень шуму та еквівалентний рівень шуму в робочій зоні поблизу пристрою не повинен перевищувати 80 дБ при вимірюванні за шкалою шумоміра [89].

Для захисту повітря в робочій зоні над сівалкою розташована витяжна шафа та зонд. Відходи від процесу вирощування насіння дуже малі і характеризуються культуральною рідиною, що залишається після інкубації, стічними водами та промивною водою, що подається на сорочку обладнання. Всі рідкі відходи дезінфікуються і нейтралізуються перед скиданням в каналізацію для захисту навколишнього середовища. Потім вони потрапляють на очисні споруди. Спочатку здійснюється механічне

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		140

очищення. Воно включає в себе проціджування крізь сита, фільтрацію, відстоювання, гідроциклонне очищення та флотацію. Після цих процесів ступінь очищення стічних вод становить близько 50%. Завершальним етапом очищення стічних вод є хімічна обробка вапном, хлорування, обробка озоном тощо. Як альтернатива хімічному очищенню можливе також фізико-хімічне очищення з використанням адсорбентів (наприклад, активованого вугілля, цеоліту). У цьому випадку ступінь очищення стічних вод становить близько 85% [79].

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		141

ВИСНОВКИ

1. В проєкті технології виробництва лікувально-профілактичного препарату на основі лізату лактобактерій як промисловий продуцент обрано модифікований штам *Lactobacillus delbruecki* TS1-06, який рекомендовано для одержання медичних препаратів імуномодулюючої, лікувально-профілактичної дії, має суттєві технологічні переваги.

2. Проаналізувано методи селекції промислових продуцентів та запропоновано схему отримання високопродуктивних виробничих штамів шляхом штучного добору.

3. З урахуванням фізіолого-біохімічних особливостей продуцента *Lactobacillus delbruecki* TS1-06 визначено оптимальні умови культивування: температура $39 \pm 1^\circ\text{C}$, рН 3,8-4,2, час інкубації 12 год, регулярне перемішування 200 об/хв, збалансоване поживне середовище.

4. На етапі отримання посівного матеріалу підібрано та сконструйовано інокулятор об'ємом 0,1 м³ для отримання необхідної кількості посівного матеріалу (0,050 м³) для культивування у ферментері за один виробничий цикл.

5. Розроблено технологічну та апаратурну схему виробництва лікувально-профілактичного препарату на основі лізату лактобактерій у вигляді порошку у скляних флаконах по 5 мл згідно з аналітичною нормативною документацією та методами контролю якості готового продукту.

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Висновки</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Томілко К.О.</i>				<i>Д</i>	<i>142</i>	<i>152</i>
<i>Консульт.</i>								
<i>Керівник</i>		<i>Яловенко О.І.</i>				<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського</i>		
<i>Затвер.</i>						<i>ФБТ</i>		

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Імуномодулятор “бластен”: пат. 65133 Україна: МПК: А61К 35/74, С12R 1/225, А61К 47/36, С12N 1/20, А61Р 37/02. Заявл. 15.03.2004. 3 с.
2. Патент RU2317326С1, Штамм bifidobacterium longum ро-6, який використовується для отримання кисломолочних, ферментованих і неферментованих харчових продуктів, заквасок, гігієнічних і косметичних засобів, біологічно активних добавок і бактерійних препаратів. / [Т.А. Левченко](#), [А. М. Лянная](#).- Оpubлiковано 20.02.2008
3. G. Perdtgon, M. E. de Macias, S. Alvarez, G. Oliver, A, A. de Ruiz Holgado Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice // Infect Immun. - 1986. - 53(2). - P. 404-410.
4. Popova P., Guencheva G., Davidkova G., Bogdanov A., Pacelli E, Opalchenova G., Kutzarow T., Koychev C. Stimulating effect of DEODAN (an oral preparation from Lactobacillus bulgaricus "LB51") on monocytes/macrophages and host resistance to experimental infections // Int. J. Immunopharmacol. 1993. - 15(1). - P. 25-37.
5. Патент RU2391393С1, Штамм Lactobacillus Delbrueckii TS1-06, тспользуемый для изготовления бактериальных препаратов и производств жидкой молочнокислой закваски в качестве продукта питания лечебно-профилактика / Г.Г.Алехина, А.Н.Суворов, А.Н.Бочкарева.- Оpubлiковано 27.03.2006
6. Определитель Бактерий Берджи, Москва, Изд-Во Мир, 1997, Т.2, С.574
7. Lactobacillus molecular biology: from genomics to probiotics, Ljungh Å., Wadström T. (eds.). Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2009, 206 p.
8. *Климко А. И., Чердынцева Т. А., Брюханов А. Л.* Пробиотические

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробив</i>		<i>Томилко К.О.</i>			<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Консульт.</i>					<i>Д</i>	<i>143</i>	<i>152</i>
<i>Керівник</i>		<i>Яловенко О.І.</i>			<i>КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ</i>		
<i>Затвер.</i>							
<i>Список літератури</i>							

Свойства Молочнокислых Бактерий Рода Lactobacillus // Тезисы XII Молодёжной Школы-Конференции С Международным Участием Актуальные Аспекты Современной Микробиологии. — Макс Пресс Москва, 2017. — С. 52–54.

9. Draing C., Sigel S., Deininger S., Traub S., Munke R., Mayer C., Hartunga T. (2018). Cytokine induction by grampositive bacteria. Immunobiology. 213, 285–296.

10. Ellouz AF, Ciorubaru R, Lederer E. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan subunits. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1974. 59. 1317-1325

11. Бактерии рода Lactobacillus: общая характеристика и методы работы с ними: Учебно-методическое пособие / Д.Р. Яруллина, Р.Ф. Фахруллин. – Казань: Казанский университет, 2014. – 51 с

12. Lactobacillus delbrueckii subsp. indicus subsp. nov., isolated from Indian dairy products / [F. Felis, E. Giovanna, A. Castioni та ін.]. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2005. – №55. – С. 401–404.

13. Dave R.I., Shah N.P. / Evaluation of media for selective enumeration of Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus, Lactobacillus acidophilus, and Bifidobacteria // J. Dairy Sci., 1996. - Vol. 79, N 9. - p. 1529-1536

14. Яруллина Д.Р., Фахруллин Р.Ф. Бактерии рода Lactobacillus: общая характеристика и методы работы с ними (Учебно-методическое пособие) // Казань: КФУ, 2014. - 51 с.

15. Клінічна фармакологія: підручник (ВНЗ IV р. а.) / О.Я. Бабак, А.Н. Біловол, Н.П. Безугла та ін.; за ред. О.Я. Бабака, О.М. Біловола, І.С. Чекмана

16. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл. №4. 2003. С 50-58

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Эм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		144

17. Михайлова М., Мінкова С., Кімура К., Сасаки Т., Ісава К. (квітень 2007 р.). "Виділення та характеристика *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* і *Streptococcus thermophilus* з рослин Болгарії" . Мікробіологічні листи FEMS . 269 (1): 160–9. doi : 10.1111/j.1574-6968.2007.00631.x . PMID 17257163 .

18. И.В. Соловьева, А.Г. Точилина, Н.А. Новикова, Изучение Биологических Свойств Новых Штаммов Рода *Lactobacillus*, Общая Биология Вестник Нижегородского Университета Им. Н.И. Лобачевского, 2010, № 2 (2), С. 462–468.

19. Minervini F, Celano G, Lattanzi A et al. Lactic acid bacteria in durum wheat flour are endophytic components of the plant during its entire life cycle. *Appl Environ Microb* 2015;81:6736–48.

20. Mercier J, Lindow SE. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl Environ Microb* 2000;66:369–74.

21. Müller M, Lier D. Fermentation of fructans by epiphytic lactic acid bacteria. *J Appl Bacteriol* 1994;76:406–11.

22. Спосіб одержання природного імуномодулятора : пат. 63201 : A61P 37/02, C12R 1/225, A61K 35/74, C12N 1/20. Опубл. 15.01.2004. 5 с.

23. Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl Environ Microb* 2008;74:4985–96

24. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008 Dec;72(4):728-64, Table of Contents. doi: 10.1128/MMBR.00017-08. PMID: 19052326; PMCID: PMC2593565.

25. Dagley S., Nicholson D. E., An Introduction to Metabolic Pathways, Wiley, New York, 1970

26. Лізати бактерій: що це таке, особливості и застосування // Likar.net.ua. і URL: <http://likar.net.ua/novunu/3752-Izati-baktery-scho-ce-take-osoblivost-zastosuvannya- sylru.html>

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		145

27. Королева, Н.С. Симбиотические закваски термофильных бактерий в производстве кисломолочных продуктов / Н.С. Королева, М.С. Кондратенко.- М.: Пищевая промышленность, 1978. - 168 с.

28. І.Ф. Ільїнська, І.В. Копосова, І.В.Ткаченко (23 березня 2007). Загальна характеристика імуномодуляторів та їх класифікації.

29. Квасников, У.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / У.И. Квасников, О.А. Нестеренко. М.: Наука, 1975.- 389 с.

30. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммунодефициты: диагностика и иммунотерапия // Лечащий врач. 1999. – № 2–3. – С. 63 – 69.

31. Lamers C. et al. Azathioprine: an update on clinical efficacy and safety in inflammatory bowel disease // Scand. J. Gastroenterol. – 1999. – Vol. 230. –Suppl. 1. – P. 111 – 115.

32. Беспоместных К.В. Исследование биохимических и морфологических свойств штаммов бактерий рода *Lactobacillus* / К.В. Беспоместных, А.Г. Галстян, Е.В. Короткая // Техника и технология пищевых производств. – 2011. – № 2. – С. 94-98.

33. Афиногенова В.П. Иммунотерапия: механизм действия и клиническое применение иммунокорректирующих препаратов / Афиногенова В.П., Лукачев И.В., Костинов М.П. // Лечащий врач. - 2010. № 4. URL: <https://www.Ivrach.ru/2010/04/12830578/> (дата звернення 18.02.2019)

34. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. Киев, 2010.- 552с.

35. Имунофан – пептидный препарат нового поколения в лечение инфекционных и онкологических заболеваний: свойства, область применения / Покровский В.И., Лебедев В.В., Шелепова Т.М. и соавт. // Практикующий врач. 1998. – № 12. – С. 14 – 15.

36. Блинов, В.А. Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Эм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		146

37. Bintsis T. Lactic acid bacteria: their applications in foods. *J Bacteriol Mycol.* 2018;5:1065.

38. РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН З КЛІТИННИХ СТИНОК *LAC. PLANTARUM* / А. Т. Безусов та ін. *Scientific Works.* 2022. Т. 2, № 85. С. 120–127. URL: <https://doi.org/10.15673/swonaft.v2i85.2248> (дата звернення: 02.04.2023).

39. NCBI. Дані зібрані з Genbank, 2018. Доступно за адресою: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>.

40. Endo A, Futagawa-Endo Y, Dicks LMT. Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches. *Syst Appl Microbiol* 2009;32:593–600.

41. Gerber D., Bonham C., Thomson A. Immuno-suppressive agents: recent developments in molecular action and clinical application // *Transplant. Proc.* – 1998. – Vol. 30. – P. 1573 – 1581.

42. Kvasnikov EI , Kovalenko NK, Nesterenko OA. Lactic acid bacteria in nature and the national economy. *Appl Biochem Microbiol* 1983;18:665–76.

43. Фрейдлин И.С. Структура, функции и регуляция иммунной системы // *Иммунодефицитные состояния.* – СПб.: Фолиант, 2000. – С. 17 – 90.

44. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммунодефициты: диагностика и иммунотерапия // *Лечащий врач.* 1999. – № 2–3. – С. 63 – 69.

45. Colvin O. An overview of cyclophosphamide development and clinical application // *Curr. Pharm. Des.* – 1999. – Vol. 5. – P. 555 – 562.

46. NCBI. Дані зібрані з Genbank, 2018. Доступно за адресою: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>.

47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

48. Kanmani P, Albarracin L, Kobayashi H, Hebert EM, Saavedra L, Komatsu R, Gatica B, Miyazaki A, Ikeda-Ohtsubo W, Suda Y, Aso H, Egusa S, Mishima T, Salas-Burgos A, Takahashi H, Villena J and Kitazawa H (2018)

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Эм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		147

Genomic Characterization of *Lactobacillus delbrueckii* TUA4408L and Evaluation of the Antiviral Activities of its Extracellular Polysaccharides in Porcine Intestinal Epithelial Cells. *Front. Immunol.* 9:2178. doi: 10.3389/fimmu.2018.02178

49. Sun Z, Harris HM, McCann A, Guo C, Argimón S, Zhang W, Yang X, Jeffery IB, Cooney JC, Kagawa TF, Liu W, Song Y, Salvetti E, Wrobel A, Rasinkangas P, Parkhill J, Rea MC, O'Sullivan O, Ritari J, Douillard FP, Paul Ross R, Yang R, Briner AE, Felis GE, de Vos WM, Barrangou R, Klaenhammer TR, Caufield PW, Cui Y, Zhang H, O'Toole PW. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat Commun.* 2015 Sep 29;6:8322. doi: 10.1038/ncomms9322. PMID: 26415554; PMCID: PMC4667430.

50. Nilsen T, Nes IF, Holo H. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl Environ Microbiol.* (2003) 69:2975–84. doi: 10.1128/AEM.69.5.2975-2984.2003

51. Suárez N, Bonacina J, Hebert E, Saavedra L. Genome mining and transcriptional analysis of bacteriocin genes in *enterococcus faecium* CRL1879. *J Data Mining Genomics Proteomics* (2015) 6:1. doi: 10.4172/2153-0602.1000180

52. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* (2015) 13:722–36. doi: 10.1038/nrmicro3569

53. Z S., Al. E. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera [Electronic resource] // *Nat Commun.* 2015. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/514?genome_assembly_id=256471.

54. Klaenhammer T.R. et al. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health // *FEMS Microbiol. Rev.* 2005. Vol. 29, № 3. P. 393–409

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Эм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Подпис</i>	<i>Дата</i>		148

55. Todd R. Klaenhammer, Rodolphe Barrangou, B. Logan Buck, M. Andrea Azcarate-Peril, Eric Altermann, Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 29, Issue 3, August 2005, Pages 393–409, <https://doi.org/10.1016/j.fmrre.2005.04.007>

56. Stokes, H. W., and B. G. Hall. 1985. Sequence of the *ebgR* gene of *Escherichia coli*: evidence that the EBG and LAC operons are descended from a common ancestor. *Mol. Biol. E* vol. 2:478-483.

57. Johansen E. Use of Natural Selection and Evolution to Develop New Starter Cultures for Fermented Foods // *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2018. Vol. 9, № 1. P. 411–428.

58. Cavanagh D., Fitzgerald G.F., McAuliffe O. From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment // *Food Microbiol.* 2015. Vol. 47. P. 45–61.

59. Chen J. et al. Adaptation of *Lactococcus lactis* to high growth temperature leads to a dramatic increase in acidification rate // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5, № 1. P. 14199.

60. Оборудование микробиологических производств / К.А.Калуныц, Л.И. Голгер, В.Е. Балашов. – М.: Агропромиздат, 1987.-398 с

61. Patnaik R. et al. Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance // *Nat. Biotechnol.* 2002. Vol. 20, № 7. P. 707–712

62. Банникова Л.А., Королева Н.С., Семенихина В.Ф. Технология и техника промышленного производства цельномолочных и молочноконсервных продуктов. Биологические основы молочного производства (справочник). ВО «Агропр. Москва, 1987

63. Основи генетичної та клітинної інженерії. Ч. I. Генетичне конструювання *in vivo*: метод. вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / Уклад. : І.Р. Клечак, Т.С. Тодосійчук, В.М. Ліновицька, Л.О. Тітова. – Київ : КПІ імені Ігоря Сікорського, 2017. – 50 с.

					ДП 6218. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		149

64. Börner R.A. et al. Genome editing of lactic acid bacteria: opportunities for food, feed, pharma and biotech // FEMS Microbiol. Lett. 2019. Vol. 366, № 1.

65. Телюк П. Вплив натрію, калію та кальцію на розвиток *Lactococcus lactis* : автореф. ДИПЛОМНА РОБОТА. Київ, 2021. 60 с.

66. Основи генетичної та клітинної інженерії. Ч. I. Генетичне конструювання *in vivo*: метод. вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / Уклад. : І.Р. Клечак, Т.С. Тодосійчук, В.М. Ліновицька, Л.О. Тітова. – Київ : КПІ імені Ігоря Сікорського, 2017. – 50 с

67. Ліастен (бластен) – новий вітчизняний імуномодулятор біологічного походження. URL: <https://mobil-medical.com/liasten-blasten-novij-vitchiznyanij-imunomodulyator-biologichnogo-pohodzhennya/>

68. Encyclopedia of Dairy Sciences / P. Fox, J. Fuquay. – М: Academic Press, 2011. – 2500 с.

69. СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2015 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика».

70. Старовойтова С.О., Скроцька О.І., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П. Технологія пробіотиків : підручник – К.: НУХТ, 2012. 318 с.

71. Методичні рекомендації щодо приготування і застосування робочих розчинів мийних, дезінфекційних, мийно-дезінфекційних засобів та антисептиків. - Наказ МОЗ України від 14 грудня 2001 р. № 502.

72. СНИПП-90-81. Производственные здания промышленных предприятий. Нормы проектирования. Москва, "Стройиздат", 1982.

73. СН-305-77. Санитарные нормы проектирования промышленных предприятий. Москва, "Стройиздат", 1977.

74. Тюрин М.В. К механизму антагонистической активности лактобацилл / М.В. Тюрин, Б.А. Шендеров, Н.Г. Рахимова и др. // Микробиология. 1989. - N 2. - С. 3-8.

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		150

84. ГОСТ 20680–86 «Аппараты с механическими перемешивающими устройствами вертикальные. Общие технические требования»

85. ГОСТ 6533–78 «Днища эллиптические отбортованные стальные для сосудов, аппаратов и котлов. Основные размеры»

86. Стренк Ф. Перемешивание и аппараты с мешалками. Польша, 1971. пер. с польск. под ред. Шупляка И.А. – Л.: «Химия». 1975.- 384с.

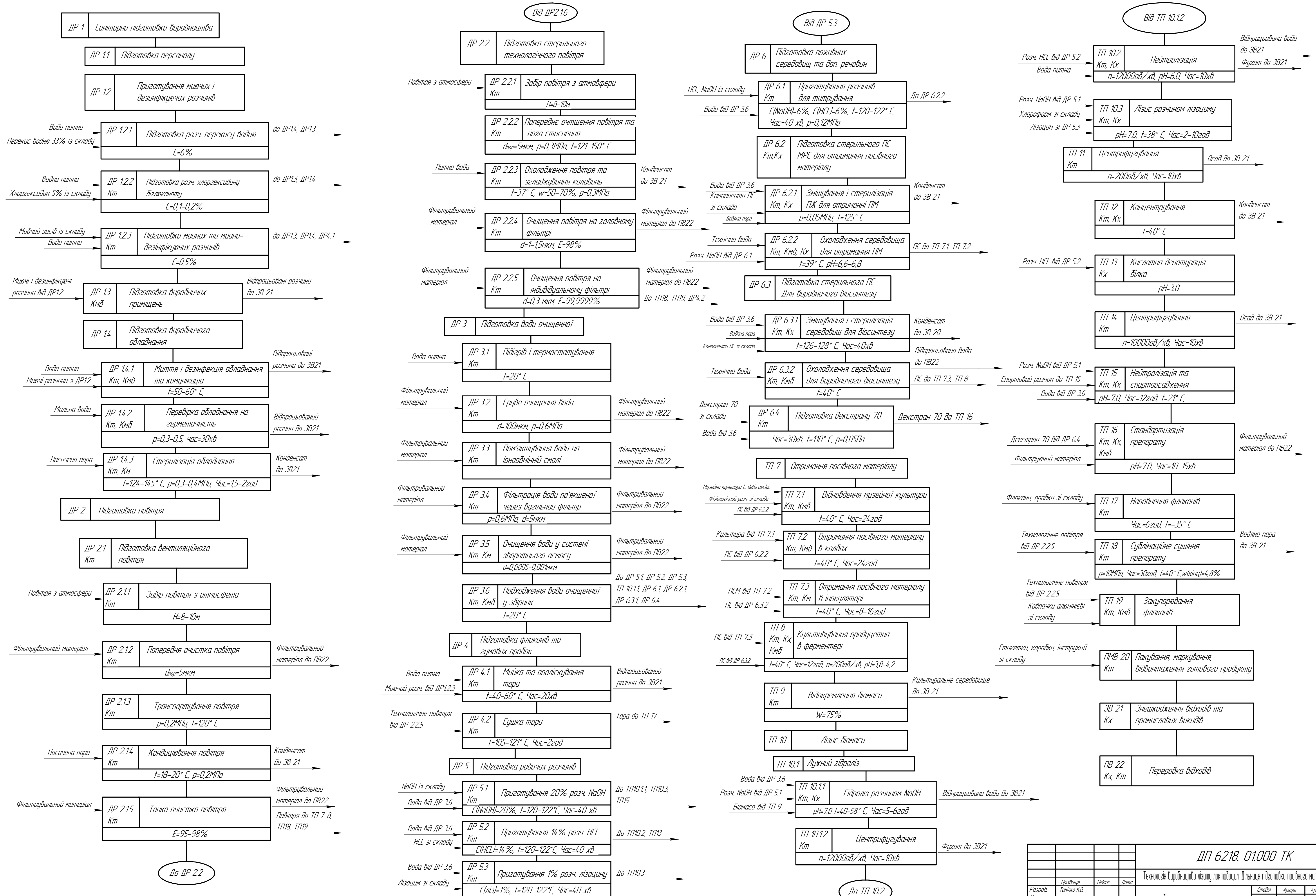
87. Основы проектирования химических производств: Учебник для вузов /Под ред. А. И. Михайличенко. – М.: ИКЦ «Академкнига» 2010. – 371 с.

88. Колуныяц Л.И. Оборудование микробиологических производств / К. А. Калуныяц, Л. И. Голгер, В. Е.Балашов // Москва, Агропроиздат, 1987. – 398 с

89. ГОСТ 12.1.038-82. «Будівництво. Електробезпека. Гранично допустимі значення напруг дотику і струмів.»

90. ГОСТ 24444-87. Оборудование технологическое. Общие требования монтажной технологичности.

					<i>ДП 6218. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Эм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Подпис</i>	<i>Дата</i>		152



Лист № 1
Лист № 2
Лист № 3
Лист № 4
Лист № 5
Лист № 6
Лист № 7
Лист № 8
Лист № 9
Лист № 10
Лист № 11
Лист № 12
Лист № 13
Лист № 14
Лист № 15
Лист № 16
Лист № 17
Лист № 18
Лист № 19
Лист № 20
Лист № 21
Лист № 22
Лист № 23
Лист № 24
Лист № 25
Лист № 26
Лист № 27
Лист № 28
Лист № 29
Лист № 30
Лист № 31
Лист № 32
Лист № 33
Лист № 34
Лист № 35
Лист № 36
Лист № 37
Лист № 38
Лист № 39
Лист № 40
Лист № 41
Лист № 42
Лист № 43
Лист № 44
Лист № 45
Лист № 46
Лист № 47
Лист № 48
Лист № 49
Лист № 50

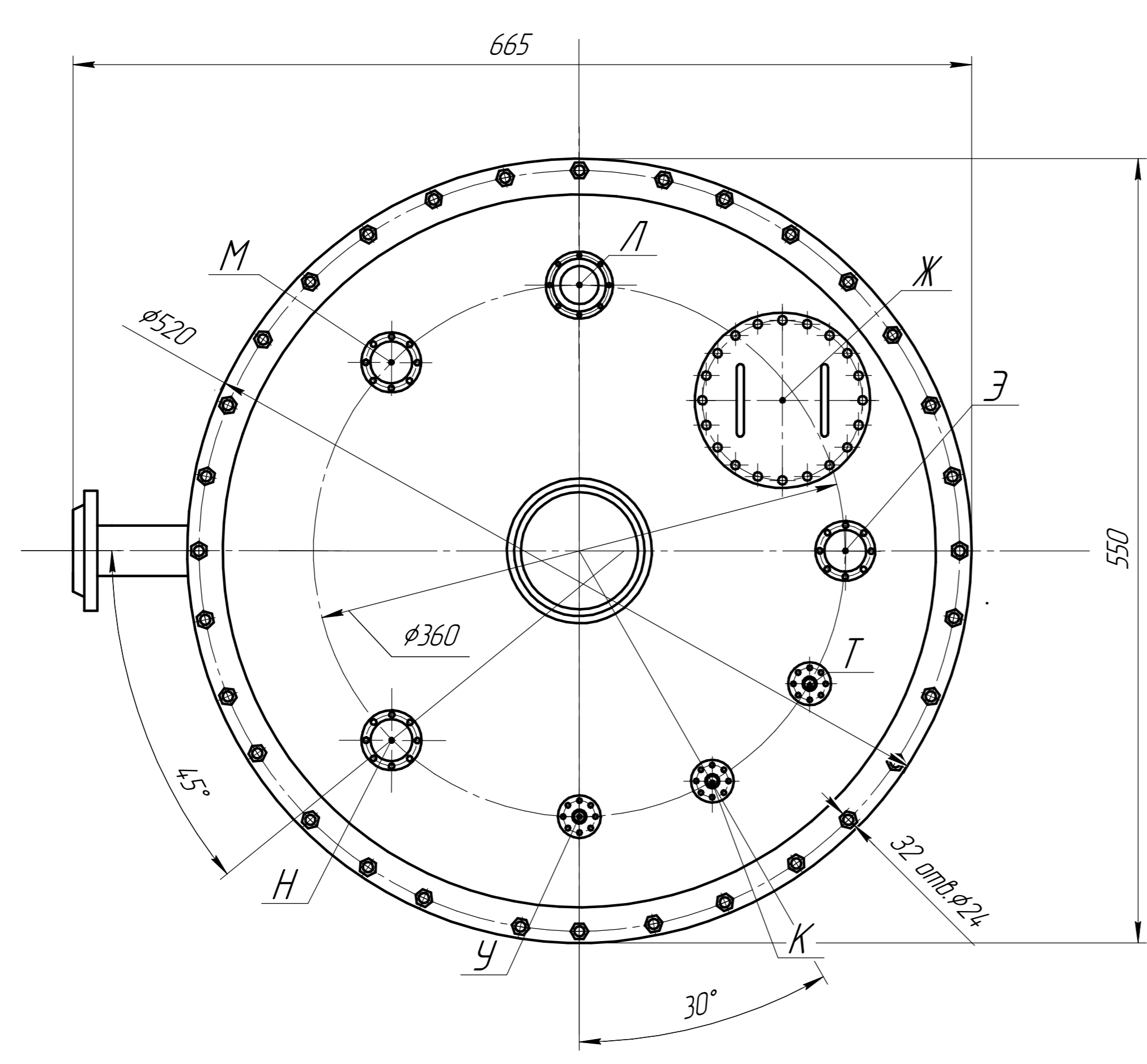
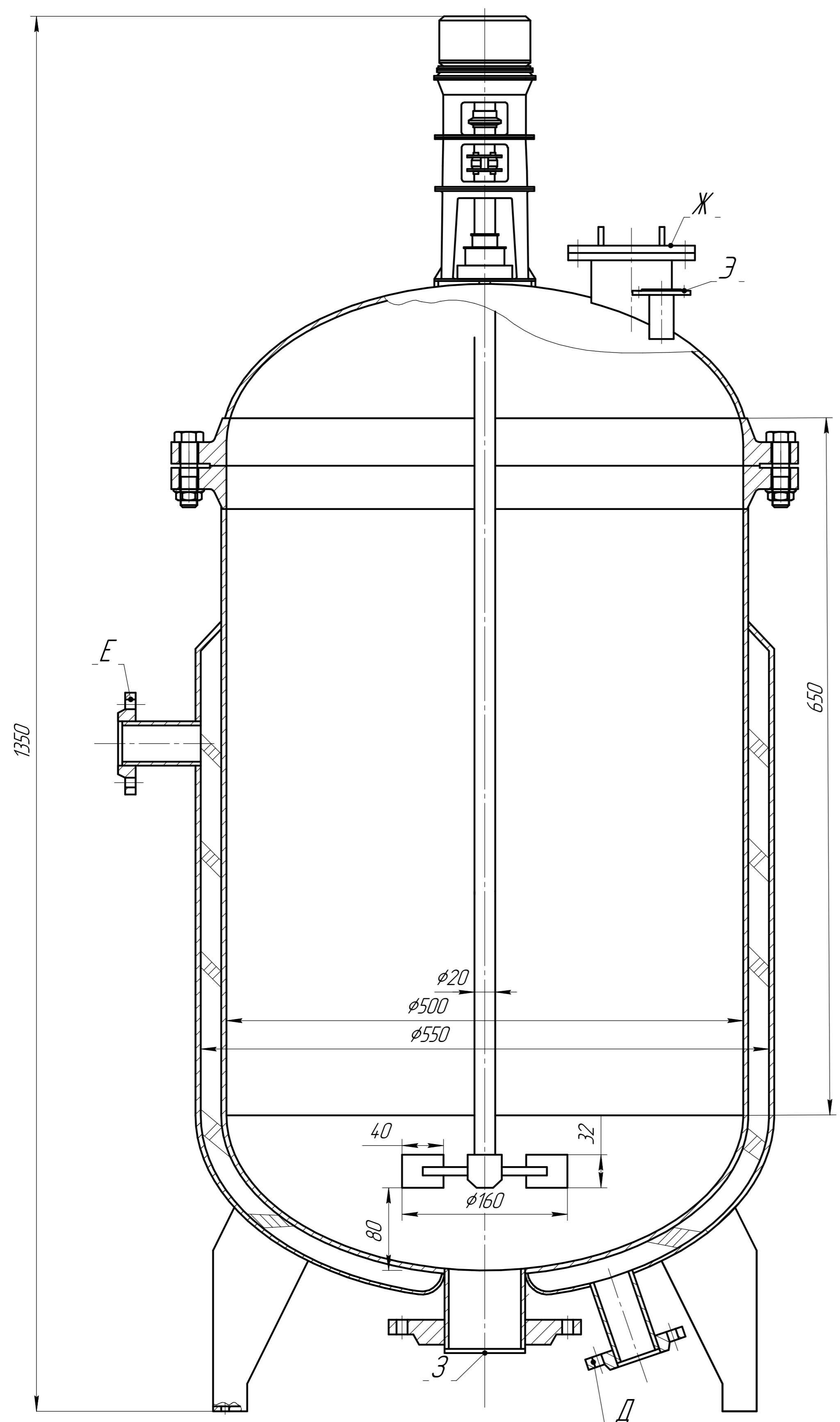
ДП 6218. 01.000 ТК		
Технологія виробництва лізату лактобацил		
Президиє	Підпис	Дата
Розроб.	Томіко К.О.	
Конс.		
Конс.		
Керівн.	Яковенко О.І.	
Затв.		
Сторінка	Архив	Архив
Д	1	1
КПІ Ігоря Сікорського ФБТ		
Копіював		
Формат А1		

Таблиця штуцерів

Позначення	Найменування	Кіл.	Ду, мм	Р _у , МПа	Примітка
Д	Вихід теплоносія з рубашки	1	50	0,25	
Е	Вхід теплоносія в рубашку	1	50	0,25	
З	Вхід поживного середовища	1	50	0,25	
Ж	Люк	1	150	0,25	
З	Вихід продукту	1	150	0,25	
Л	Технологічний штуцер	1	80	0,25	
М	Вхід посівного матеріалу	1	80	0,25	
Н	Запасний	1	80	0,25	
У	Гільза термометра	1	M25x15	0,25	
К	Датчик рН	1	M25x15	0,25	
Т	Датчик манометру	1	M25x15	0,25	

Технічна характеристика

- Апарат призначено для вирощування посівного матеріалу *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 для виробництва лізату лактобактерій.
- Робочий об'єм, $0,05 \text{ м}^3$
- Номинальний об'єм, $0,1 \text{ м}^3$
- Температура, °C
 - початкова теплоносія 43°C
 - середовища 39°C
- Тип перемішувача пристрою-мішалка відкрита турбінна шестилопатева.
- Кількість мішалок, 2
- Кількість відвідних перегородак, 0
- Частота обертання вала мішалки, 1 с^{-1}
- Потужність електродвигуна, 0,12 кВт
- Габаритні розміри:
 - ширина, 550 мм;
 - довжина, 665 мм;
 - висота, 1350 мм.
- Маса, 185 кг.



Позначення	Найменування	Кіл.	Примітки
Складальні одиниці			
1	Корпус	1	
2	Кришка	1	
3	Привід мішалки	1	
4	Мішалка	2	
5	Опори	4	
6	Сарочка	1	
7	Днище	1	
Стандартні вироби			
9	Болт 2M24x14.0	32	
10	Шайба 2M24x14.0	32	
11	Гайка 2M24x14.0	32	

Технічні вимоги

- Апарат повинен відповідати "Правилам встановлення і безпечної експлуатації апаратів, що працюють під тиском".
- Провести гідравлічні випробування апарату на міцність прайним тиском 0,25 МПа.
- Зварні шви контролювати рентгенопробіркою або УЗД.
- Призначення штуцерів - див. таблицю штуцерів.
- Дієсне розташування штуцерів, опор, люка - див. на вигляді зверху.
- Граничні відхилення на виліт штуцерів 5мм.
- Фланцеві з'єднання кришки і люка опломбувати.

				ДП 6218. 03.000 ТК		
				Технологія виробництва лізату лактобацил. Дільниця підготовки посівного матеріалу		
Розроб.	Горіло К.О.	Підпис.	Дата.	Посівний апарат для вирощування посівної культури <i>Lactobacillus delbrueckii</i> TS1-06		Аркуш 1
Конс.	Шибельський В.В.					Архів Масштаб 1:1
Конс.	Яковенко О.І.					ІНТУУ "КПІ ім. І.Сікорського" ФБТ
Керівн.						
Зам.						