МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІНСТИТУТІНОВАЦІЙНИХ ОСВІТНІХ ТЕХНОЛОГІЙ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри

_____ Барановський М.М.

«___» _____2019р.

ДИПЛОМНА РОБОТА

(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬО-КВАЛІФІКАЦІЙНОГО РІВНЯ

«МАГІСТР»

Тема: Удосконалення технології пробіотичного препарату Біфідобактируну

Виконавець: студентка гр.БР-101Мз, Вечорик Ю.В

Керівник: д.б.н., професор, Патика В.П

Консультанти з розділів:

Охорона праці – доц.каф. (ПІБ)

Охорона навколишнього природнього середовища – доц. каф.екології (ПІБ)

Нормоконтролер: асист. каф. біотехн. Лазарєв В.Г.

Київ 2019

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «**Удосконалення виробництва препарату Біфідобактерину**»:63 сторінки, 7 таблиць, 2 креслення формату А1.

Предмет дослідження — Біфідобактерин

Об'єкт дослідження — *Bifidobacterium bifidum*

Мета роботи — покращити виробництво препарату Біфідобактеину

Актуальність: Актуальність полягає у використанні таблетованих форм Біфідобактерину замість порошку. При лікуванні захворювань органів травлення в деяких випадках погано всмоктуються лікарські препарати у вигляді порошку, тому заміна його на таблетовані форми призведе до покращення положення препарату на ринці збуту та дозволить досягти їх високої концентрації в шлунково-кишковому тракті і отримати хороший місцевий ефект без побічних реакцій. Як правило, для потрапляння в мішень лікарські речовини з шлунково-кишкового тракту повинні всмоктатися в кров. Ось тільки далеко не кожне з них здатне здійснити це завдання, адже в шлунку розташовується один з основних внутрішніх агресорів організму - соляна кислота. За допомогою саме таблетованих форм Біфідобактерину, процес всмоктування та дії речовини значно покращиться.

Ключові слова: *біфідобактерії, Біфідумбактерин, Bifidobacterium bifidum, пробіотик, дисбактеріоз, біосинтез, поживне середовище.*

ВСТУП

На сьогоднішній день важливим питанням є вирішення проблеми захворюванності людей на дисбактеріоз, що складає 90% всього населення. Пропонується широкий вибір продуктів, лікарських засобів, спрямованих на відновлення номального біоценозу організму людини [4].

На сучасному фармацевтичному ринку представлено великий асортимент препаратів на основі нормальної мікрофлори людини. Нині пробіотики розглядаються як ефективний метод відновлення складу та функції біоценозу людини. А поява нової науково обгрунтованої інформації з цього питання створює величезні перспективи для поповнення арсеналу фармацевтичного ринку новими ефективними бактеріотерапевтичними препаратами [4].

Пробіотики, крім дисбактеріозу, призначаються й ряду інших захворювань: алергії, мігрені, фарингіті, бронхіті та пневмонії, синдромі хронічної втоми, астмі, остеохондрозі, цукровому діабеті, гіпоглікемії, циститі та ін. [1].

З'являються препарати на основі нових, нетрадиційних видів мікроорганізмів, розробляються полікомпонентні пробіотики, пребіотики, синбіотики, препарати, на основі іммобілізованих клітин [2, 4, 34].

Основною групою мікроорганізмів, які використовуютья у складі сучасних пробіотичних препаратів є бактерії родів *Bifidobacterium* і *Lactobacterium*. Це пов'язано з тим, що вони є основною мікрофлорою кишківника людини [35].

Останнім часом звертають на себе увагу пробіотичні бактерії іммобілізовані на сорбенті. Припускається, що, на відміну, від дифузного розподілу клітин пробіотичної мікрофлори, такі штучні мікроколонії за

рахунок електростатистичних і хімічних властивостей адгезуються на слизовій оболонці кишківника і активно взаємодіють з пристінковим шаром, формуючі репродукційну дозу [8].

Одним з представників цього класу препаратів – пробіотиків є Біфідумбактерин форте. Він являє собою іммобілізовані на активованому вугіллі клітини біфідобактерій. Агреговані на вугіллі бактерії створюють оптимальну пристінкову концентрацію еубіотичних мікробних клітин. Сорбент у свою чергу сприяє активному зв'язуванню токсичних речовин, що беруть участь у патогенезі дизфункцій травного тракту. Як всі біологічні препарати, Біфідумбактерин форте призначений для корекції порушень мікробіоценозу, що виникають при різних захворюваннях з ураженням шлунково-кишкового тракту [5,8].

Актуальність. Актуальність полягає у використанні таблетованих форм Біфідобактерину замість порошку. При лікуванні захворювань органів травлення в деяких випадках погано всмоктуються лікарські препарати у вигляді порошку, тому заміна його на таблетовані форми призведе до покращення положення препарату на ринці збуту та дозволить досягти їх високої концентрації в шлунково-кишковому тракті і отримати хороший місцевий ефект без побічних реакцій.Як правило, для потрапляння в мішень лікарські речовини з шлунково-кишкового тракту повинні всмоктатися в кров. Ось тільки далеко не кожне з них здатне здійснити це завдання, адже в шлунку розташовується один з основних внутрішніх агресорів організму - соляна кислота. За допомогою саме таблетованих форм Біфідобактерину, процес всмоктування та дії речовини значно покращиться.

Новизна роботи. Використання штаму *Bifidobacterium bifidum* 79-12, час культивування якого становить лише 12 год, володіє більш високою кислотоутворюючою та антагоністичною активністю по відношенню до ряду патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів, таких як *Shigella sonnei, Shigella flexneri, Escherichia coli, Staphilococcus aureus, Proteus vulgaris* [7].

РОДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

Біфідумбактерин форте є ліофільно висушеною мікробною масою живих біфідобактерій *Bifidobakterium bifidum* 79-12. Має вигляд пористої маси сірого кольору різної інтенсивності.

Речовини, що входять доскладу пробіотику

Допоміжні речовини: крім інгредієнтів середовища культивування містить інгредієнти стабілізуючого середовища висушування.

Сахароза (ГОСТ 5833-75)

Желатин (ГОСТ 11293-89)

Молоко знежирене (ДСТУ 2661-94)

Форма

Порошок (кристалічна або пориста масса).

Біологічні та імунобіологічні властивості

Терапевтичний ефект Біфідумбактерину форте визначає наявність в ньому живих біфідобактерій, що є антагоністами по відношенню до широкого спектру патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів і, тим самим, нормалізуючи мікрофлору кишечника.

Високий кількісний рівень біфідофлори і її переваги в мікробіоценозі досягається при використанні біфідобактерину, що нормалізує діяльність шлунково-кишкового тракту, покращує розвиток затяжних форм кишкових захворювань, підвищує неспецифічну резистентність організму.

Мікроколонії сорбованих біфідобактерій забезпечують швидке відновлення нормальної мікрофлори, яка , будучи природним біосорбентом , акумулює вв організмі токсичні організми. Сорбованих біфідобактерій активізують відновлювальні процеси в слизових оболонках, синтез вітамінів і амінокислот, підсилюють імунний захист організму.

За механізмом дії Біфідумбактерин форте – багатофакторний лікувальний засіб, що має антагоністичну активність відносно широкого спектру патогенних і умовнопатогенних мікроорганізмів і здійснює корегуючий вплив на бактеріоценоз, який стимулює місцеві репаративні процеси у кишечнику.

Показання до використання

Біфідумбактерин форте призначають для лікування дітей та дорослих. Дітям, у тому числі недоношеним, препарат застосовують з перших днів життя.

Біфдумбактерин форте призначають для лікування:

-при тривалих кишкових дисфункціях невизначеної етіології;

-хворим на пневмонію, сепсис та інші гнійноінфекційні захворювання, для профілактики або усунення розладів функції кишечника та запобігання розвитку виразково-некротичного ентероколіту;;

- хворимна анемію, гіпотрофію, рахіт, діатез та іншими проявами алергії; при захворюванні кашлюком, особливо при наявності у них різних розладів функції кишечника;

- кишкових дисфункцій як наслідок дисбактеріозу кишечника, що виник після тривалої антибактеріальної, гормональної, променевої та інших видів терапії при стресових ситуаціях та перебування в екстримальних умовах, а також з метою профілактики вказаної патології;

- при порушенні чистоти вагінального секрету до III-IV ступенів, у вагітних групи «ризику», при бактеріальних кольпітах, викликаних стафілококом та кишковою паличкою, а також при сенільних кольпітах гормональної природи.

Спосіб застосування

Препарат застосовують у вигляді розчину внутрішньо.

Побічна дія

Застосування Біфідумбактеринафорте, як правило, не викликає реакцій. У процесі лікування у виняткових випадках можлива поява легких диспептичних розладів, що проходять самостійно і не вимагають скасування вживання препарату чи надання будь-якої допомоги. У випадках виникнення більш

вираженої реакції доцільне тимчасове скасування або припинення лікування Біфідумбактерином форте.

Протипоказання

Вроджена недостатність лактози. Порушення всмоктування глюкози-галактози.

Затосування при вагітності та дітям

Препарат дозволений для застосування жінкам в період вагітності та грудного вигодовування. Особливих умов прийому немає.

Лікарська взаємодія

При одночасному прийомі біфідумбактерину форте з вітамінами (особливо групи В) дію препарату посилюється. При прийомі антибіотиків рекомендований інтервал між прийомом антибіотика і препарату Біфідумбактерину форте становить 3-4 годин.

Дозування

Препарат застосовують дітям з народження (в тому числі недоношеним), дорослим всіх вікових груп.

Залежностіі ввід тяжкості захворювань Біфідумбактерин форте застосовують в звичайних або збільшених дозах.

Біфідумбактерин форте з лікувальною метою в звизачайних дозах:
Дітм до року по 1 пакеті 2-3 рази а добу, дорослим по 2 пакета 2-3 рази а добу. Курс лікування при гострих токсикоінфекціях 5-7 днів, при інших захворюваннях 15-21 день.

Умови зберігання

У сухому, захищеному від світла місці при температурі від 2ºС до 8ºС. Зберігати в недоступному для дітей місці. Відпускають без рецепту.

Методи контролю (згідно АНД)

1. Опис

Порошок (кристалічна або пориста маса) сірого кольору різної інтенсивності з чорними включеннями, специфічним запахом та смаком. Визначають візуально.

2. Автентичність

Нерухливі грампозитивні поліморфні палички з біфуркацією наодному або двох кінцях, довжиною 4-5 мкм, розміщуються у вигляді скупчень або окремих клітин. Облігатний анаероб. При рості на напіврідких середовищах окремі колонії біфідобактерій мають форму дрібних «цвяхів», «крихток», «ниток» білого кольору, що утворюють при струшуванні крихковидну масу. Контроль проводять за методикою підприємства.

3. Розчинність

При додаванні води *Р* із розрахунку 1 мл на 1г порошку протягом 5 хв утворюється гомогенна завись сірувато-бежевого кольору. Визначають візуально.

4. Прозорість

Завись має бути непрозорою. Приготування розчину проводять за п.3 АНД «Розчинність». Визначають візуально.

5. Кольоровість

Завись повинна мати сірий колір. Приготування розчину проводять за п.3 АНД «Розчинність». Визначають візуально.

6. pH

Від 5.5 до 6.5. Завись готують за п.3 АНД «Розчинність». Визначають згідно з ДФУ вид. 1 р.2.2.3. с.17 потенціометрично.

7. Втрата в масі при висушуванні

Втрата не більше 3,5%. Визначають згідно ДФУ, вид.1, р.2.2.32, с. 49.

0,1 г сухої розтертої біомаси сушать у вакуум-сушильній шафі при температурі від 58 до 62ºС і за тиску від 1,5 кПа до 2,5 кПа до постійної маси.

8. Специфічна нешкідливість

Препарат має бути нешкідливим для білих мишей при введенні його перорально в кількості однієї дози.

Випробування проводять на 5-ти безпородних мишах різної статі масою 14-16 г (зважування проводять безпосередньо перед дослідом).

Порошок розводять водою *Р*із розрахунку 0,5 мл на 1 г препарату. Кожній з 5-ти мишей вводять по 0,5 мл отриманої зависі перорально в шлунок за допомогою насадки на шприц місткістю 1 мл. Термін спостереження – 5 діб.

Всі тварини повинні залишатись живими та не втратити у вазі.

У випадку загибелі за цей термін хоча б однієї миші або втрати у вазі контроль повторюють на подвоєній кількості тварин. Препарат вважають нешкідливим, якщо при повторному випробуванні не загинула жодна з мишей. У протилежному випадку дану серію бракують.

9. Стороння мікрофлора

Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, плісняви та дріжджеподібних грибів.

Визначають згідно з ДФУ, доп. 1, р. 2.6.12, с.37, р.2.6.13, N, с.42.

Зразок ліофілізованої маси у кількості 10 г поміщають у мірний флакон місткістю 250 мл, доводять до 100 мл (розведення 1:10) буферним розчином з натрію хлоридом і пептоном, pH 7,0 та перемішують до утворення гомогенної зависі.

Для визначення загальної кількості бактерій по 1 мл зависі висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з густим живильним середовищем МПА методом двошарового висівання.

Для визначення загальної кількості грибів по 1 мл зависі висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з густим живильним середовищем Сабуро методом двошарового висівання.

Посіви на середовищі МПА інкубують при 30 - 35 °С для виявлення бактерій, а посіви на середовищі Сабуро - при 20 - 25 °С для виявлення грибів протягом 5 діб, якщо вірогідні результати не будуть одержані раніше.

Для визначення окремих видів мікроорганізмів по 10 мл зависі висівають в 100 мл рідких живильних середовищ: № 3 (для виявлення бактерій роду родини *Enyerobacteriaceae*) та №8 (для виявлення *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus*). Посіви інкубують при 30 - 35 °С протягом 18-24 годин, після чого роблять пересівання з середовища № 3 на густі середовища № 4 та №

5, а з середовища № 8 - на густі середовища № 9 та № 10. Посіви інкубують при 35-37 °С протягом 24 - 48 годин. При наявності росту мікроорганізмів проводять їх ідентифікацію згідно вимог ДФУ, доп. 1, р. 2.6.13, N, с. 42.

Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, плісняви та дріжджеподібних грибів. У випадку виявлення у посівах сторонніх мікроорганізмів, контроль повторюють на подвоєній кількості зразків препарату. При відсутності росту мікроорганізмів при повторному висіві досліджуваний препарат вважають таким, що відповідає вимогам. У випадку росту сторонніх мікроорганізмів при повторному висіві зразків серію препарату бракують.

10. Специфічна активність

Специфічна активність препарату визначається за кількістю життєздатних клітин біфідобактерій та активністю кислотоутворення.

Визначення проводять за п. 10.1 АНД "Визначення кількості живих біфідобактерій".

Показник активності кислото утворення Біфідумбактерину форте, виражений в градусах Тернера (°Т), повинен бути не нижче 90. Визначення проводять за п. 10.2 АНД "Визначення активності кислотоутворення клітин".

10.1. Визначення кількості живих біфідобактерій

Визначення кількості живих біфідобактерій проводять на трьох зразках препарату від кожної серії.

Кількість живих біфідобактерій перевіряють паралельно з робочим стандартним зразком (РСЗ) Біфідумбактерину форте.

Біфідумбактерин форте являє собою висушену завись живих біфідобактерій *B. bifidum* 79-12, містить 10^7 живих мікробних клітин в одній дозі. Зберігати при температурі мінус (І8±2)°С.

Ліофільну масу розводять водою з розрахунку 1мл на 1г та залишають на 1 годину при кімнатній температурі для регідратації біомаси. Отримані мікробні суспензії препарату та РСЗ по 1 мл переносять у пробірки, що містять по 9 мл Біфідум-середовища та перемішують шляхом 12-15 кратного прокачування, отримуючи при цьому 1 г біфідобактерій в об'ємі 10 мл середовища (розведення

10^{-1}). З цих пробірок роблять послідовні десятикратні розведення до 10^{-9}. Пробірки з розведеннями досліджуваних зразків препарату іРСЗ у поживних середовищах поміщають в термостат при температурі (38±1) °С і інкубують протягом 4-х діб.

Після закінчення інкубації відмічають розведення, в яких є ріст колоній біфідобактерій.

Кількість живих біфідобактерій N водномуг визначають за формулою:

$$N = nx\ 10^{m-1}$$

де п - кількість колоній в даній пробірці

m - величина розведення мікробної суспензії.

Наприклад, у пробірці з розведенням 10^{8} міститься 3 колонії біфідобактерій:

$3 \times 10^{8-1} = 3 \times 10^{7}$

Отже, даний препарат містить $3 * 10^{7}$ живих біфідобактерій в 1 дозі.

В першу чергу враховують результат в ряду розтитрування РСЗ. Якщо ріст біфідобактерій спостерігається в розведенні не менше, ніж 10^{-8}, це свідчить про задовільні ростові властивості поживного середовища та достовірність результатів аналізу. Якщо в ряду розведень РСЗ ріст спостерігається в розведенні меншому, ніж 10^{-8}, то дослід необхідно повторити на іншій серії поживного середовища.

Препарат вважають придатним, якщо ріст біфідобактерій в ряді десятикратних розведень досліджуваного препарату відмічається не менше, ніж упробірці з розведенням 10-^{8}, що відповідає вмісту 10^{7} КУО живих мікробних клітин в одній дозі. Якщо вміст живих мікробних клітин в одній дозідосліджуваного препарату менше, чим 10^{7} КУО, а в 1 мл РСЗ - 10^{7}КУО, тоді контроль необхідно повторити на подвоєній кількості зразків.

Якщо при повторному контролі показники РСЗ відповідають пред'явленим вимогам, а показники досліджуваного препарату нижче, то серію препарату бракують.

10.2. Визначення активності кислотоутворення

Проводять титрометричним методом.

У кожному досліді враховують показники із двох зразків препарату. До ліофілізованої біомаси додають середовище Біфідум із розрахунку 1 мл на 1г порошку.

Із двох зразків розведеного таким чином препарату, переносять по 2.5 мл мікробної завісі в пробірки (d =2 см, h =20 см) з 25 мл печінкового середовища і витримують протягом (72±1) годин при температурі (38±1)°С. Після цього проводять визначення кислотності в кожній пробірці.

10 мл отриманої суспензії вносять в хімічний стакан місткістю 50 мл і титрують 0.1 М розчином *гідроксиду натрію Р*до pH 8.5±0.1. Показник pH контролюється потенціометрично.

Кислотність в градусах Тернера визначають за формулою:

$$°T = VxKxl0,$$

де:

V - об'єм0.1 М розчину *гідроксиду натрію* P_9 використаний на титрування, в мілілітрах;

К - коефіцієнт поправки до титру 0.1 М розчину *гідроксиду натрію Р.*

Середня величина активності кислотоутворєння, отримана для двох зразків повинна бути не нижче 90° Т.

У випадку отримання в одному із зразків показників кислотності нижче 90 °Т дослід повторюють. Якщо при повторному визначенні результат незадовільний –препарат бракують.

РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агенту

При виборі біологічного агенту з метою створення пробіотичного препарату важливим є підбір штаму, що відповідає усім заданим вимогам.

Штам повинен володіти пробіотичними властивостями, а саме мати високу антагоністичну активність, адгезивність, кислотостійкість, імуномоделюючу і протипухлинну властивості. Відомо, що серед усіх мікроорганізмів, заданим вимогам найбільш відповідають штами, що відносяться до родів *Bifidobacterium* і *Lactobacterium*[16].

Головною відмінністю технологічного процесу виготовлення препарату Біфідумбактерин форте, є іммобілізація клітин. Важливим, є підбір штаму відповідно до ступеня сорбції клітин відповідно до обраного сорбенту. Дослідженнями доведено [36], що активоване вугілля, яке традиційно використовується як сорбент, найкраще забезпечує адсорбцію у своїх мікропорах саме біфідобактерій. Тим самим, забезпечуючи доставку мікроорганізмів до нижніх відділів кишківника і захищаючи їх від дії несприятливих факторів шлунково-кишкового тракту.

З літературних джерел [8,12,22] відомо, що до найбільш важливої групи мікроорганізмів, що присутні в травному тракті людини, відносять *Bifidobacterium bifidum.* Тому саме цей вид біфідобактерій найчастіше використовують для створення препаратів, нормалізуючих мікрофлору людини.

Для виробництва сухих бактеріальних продуктів важливим є вивчення стійкості штамів біфідобактерій до підвищеної температури, так як одним із етапів виготовлення Біфідумбактерина форе є ліофільне висушування.

У виробництві пробіотиків використовуються наступні штами : *Bifidobacterium bifidum* 1, *Bifidobacterium bifidum* 791 [23, 24]. Ці штами традиційно використовуються вже багато років.

Але в 2012 році було представлено новий штам *Bifidobacterium bifidum* 79-12, депонований В Державній колекції нормальної мікрофлори (ГКНМ) ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора під номером 242 [24].

Обраний штам, порівняно з іншими, володіє значно вищою антагоністичною активністюдо патагенних і умовно патогенних мікроорганізмів (табл. 2.1) [24].

Таблиця 2.1.

Антагоністична активність біфідобактерій

Штам	Діаметр затримки росту патогенних мікроорганізмів (мм)				
	S.sonnei	*S. flexneri,*	*E. coli*	*S. aureus*	*P. vulgaris*
Bifidobacterium bifidum 1	2.33	4.5	2.5	6.0	3.2
Bifidobacterium bifidum 791	1.5	3.2	2.7	4.0	1.1
Bifidobacterium bifidum 79-12,	3.5	5.0	3.0	5.2	6.5

B. bifidum 79-12 стійкий до умов навколишнього середовища, максимальну біомасу накопичує (10^8-10^9) к 12 годинам [22].

2.2. Наведення складу поживного середовища

Обраний продуцент пропонується вирощувати на середовищі наступного складу, г/л:

Пептон - 2,0

Гідролізат молока - 50

Цистин солянокислий - 0,1-0,15

Лактоза - 10,0

Натрій хлористий - 2,0-3,0

Вода - все інше

2.3. Морфолого-культуральні ознаки

За морфологічними ознаками клітини роду *Bifidobacterium* являють собою неспороутворюючі, грампозитивні бактерії палички, розміром 0,5-1,3 × 1,5-8 мкм. Форма клітин варіює від прямих паличок до форм в виді ком, з булавовидними потовщеннями на кінці, іноді розгалужені (У-, Т-форми), зернисті; в чистих культурах вони більш поліморфні. Розміщення клітин одинарне, парами, іноді ланцюжками або розетками. Іноді зустрічаються роздуті клітини коковидної форми. Анаероби. Слід відмітити, що довжина та форма клітин у різних культур одних і тих же видів біфідобактерій залежить у визначній мірі від складу середовища, присутності кисню, віку культури та способу інкубації [2].

Суттєвий вплив на форму клітин і ступінь викривленості чинять присутність у середовищі вітамінів. Подовження клітин, їх витончення і фрагментування спостерігається при значному вмісті солі NaCl (до 6 %); при температурі, набагато перевищуючій оптимальну; іноді - при високому вмісті етилового спирту. На форму клітин значний вплив може чинити іонізуюче випромінювання. Тенденція до утворення ланцюжків змінюється в залежності від фази росту і pH середовища. При симбіотичному рості, чи під впливом високих концентрацій гліцину, D-амінокислот чи антибіотиків, активних у відношенні клітинної стінки, можуть спостерігатися клітини неправильної форми [2].

На щільних поживних середовищах *Bifidobacterium bifidum* утворюють колонії, зазвичай невеликого розміру діаметром 2-5 мм, з рівним краєм, випуклі, плоскі, блискучі, непрозорі, білого або світло сірого кольору з збільш темним центром. Шорсткуваті колонії не спостерігаються [6].

Ріст на рідких поживних середовищах спостерігається у вигляді рівномірного помутніння чи випадіння гомогенного чи, рідше, зернистого осаду. Утворення плівки не характерно [2].

При рості на середовищах загального призначення біфідобактерії не мають особливих запахів. Тим не менш, вони у значній мірі обумовлюють

запах продуктів бродіння, утворюючи різні леткі сполуки, такі як диацетил і його похідні, а також сірководень [19].

Клітинна стінка *B. bifidum* 79-12 представлена електронногустим гомогенним шаром товщиною 15-60 нм. Вона позитивно забарвлюється по Граму, але варто відмітити, що старі клітини можуть давати хибні результати. Хімічний склад клітинної стінки біфідобактерій доволі постійний і на нього чинять вплив зміни у складі середовищ та умови вирощування культур [19].

Склад клітинної стінки пов'язують з антигенними властивостями бактерій, оскільки найважливіші антигени розміщені саме у ній. Вона включає муреїн з різними типами хімічних зв'язків. Муреїн грампозитивних бактерій – це полімер, який складається з ланцюжків, в яких чергуються N–ацетилглюкозамін і N–ацетилмурамова кислота (ефір молочної кислоти і N–ацетилглюкозаміну). Ці компоненти зв'язані між собою 1,4–β–глікозидними зв'язками. Залишки N–ацетилмурамової кислоти пов'язані з пептидними ланцюжками, які в свою чергу зв'язані між собою поперечними пептидними містками. При кислотному гідролізі муреїну біфідобактерій виявляють глюкозамін і ряд амінокислот: L–аланін, D–глутамінову і D–аспарагінову кислоти а також L–орнітин, L–лізин, L–серин, діамінокислоту і т. д в залежності від природи мікроорганізму. Тип пептидоглікану L-Орн-L-Сер-D-Асп характерний для штаму *Bifidobacterium bifidum* 79-12 [34].

Амінокислотний склад стінки характеризує рід, а якісний склад, кількість цукру та гексозамінів відображають різницю між видами. Найбільш поширені амінокислоти у послідовності амінокислотного складу пептидних компонентів клітинної стінки – аспарагінова і глутамінова кислоти, аланін та лізин. Часто клітинні стінки біфідобактерій містять відновлюючі цукри: рамнозу та залишки галактози. Однакових пентоз і гексоз у стінці не буває [34].

Цитоплазматична мембрана - двошарова, шириною 75-85 A^0. Нуклеоїди і рибосоми мають структуру, типову для усіх прокаріот [6].

2.4. Фізіолого-біохімічні ознаки

Серед різних груп мікроорганізмів біфідобактерії, з точки зору потреб у різноманітних поживних речовинах, відносяться до найбільш вимогливих мікроорганізмів. Для нормального росту і розвитку їм необхідні субстрати з органічними формами азоту. Ці бактерії мають потребу у вітамінах, амінокислотах, пептидах, пуринових і піримідинових сполуках, солях чи ефірах жирних кислот, спеціальних ростових добавках та інших факторах росту [34].

Bifidobacterium bifidum 79-12 являється гетероферментативною паличкою [34].

Основним джерелом вуглецевого живлення *Bifidobacterium bifidum* 79-12 є моно- і дисахариди – глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза. Вуглекислий газ також відіграє важливу роль у життєдіяльності біфідобактерій. Він може навіть у деяких випадках заміняти такі фактори росту як амінокислоти (аспарагінову кислоту, фенілаланін, гістидин) і вітаміни (біотин) [24].

Щодо азотного живлення, то складні органічні форми азоту *B. bifidum* 79-12 не синтезують, тому ці форми необхідно вносити у поживне середовище [24].

Для свого розвитку біфідобактерії потребують наявності вітамінів, чим і пояснюється у значній мірі вплив на їх ріст добавок до середовищ різних рослинних екстрактів (картоплі, моркви, кукурудзи, томатів), м’ясного і дріжджового екстрактів, білкових гідролізатів та ін. [2].

Для забезпечення нормального росту і розвитку *B.bifidum* 79-12 потрібен ряд неорганічних сполук міді, заліза, натрію. калію, фосфору, йоду, сірки, магнію і, особливо, марганцю, які в свою чергу являються макро- і мікроелементами [24].

Особливості метаболізму *B. bifidum* являються результатом багаторазових дефектів геному. Це проявляється у тому, що велику кількість субстратів біфідобактерії не утилізують, хоча більшість генів, що кодують різні біосинтетичні шляхи, у хромосомі є [35].

Елективні середовища, що використовуються для забезпечення росту та збереження біфідобактерій дуже різноманітні і в свою чергу складні і багатокомпонентні [14].

Утилізація білків і пептидів вивчена мало. Протеази і пептидази не виділяються у середовище, а прикріплюються до клітинної стінки. Вони можуть впливати на субстрат після лізису клітин.

Оптимальний рівень pH для штаму *Bifidobacterium bifidum* 79-12 лежить у межах 5,5-6,0. Ріст припиняється при pH 3,6-4,0[24].

Оптимальний ріст штамів спостерігається при анаеробних чи мікроаерофільних умовах. Стимулювати ріст може збільшена концентрація вуглекислого газу [34].

Оптимальний рівень росту для штаму *Bifidobacterium bifidum* 79-12 складає 37 ± 1 ^{0}C [24].

Штам *Bifidobacterium bifidum* 79-12 має високий ступінь антагоністичної активності, що пов'язано з інгібуючою дією молочної та оцтової кислоти, бактеріоцинів, лізоциму та з іншими метаболітами, що здатні знижувати pH, а також конкуренцією за сайти прикріплення на оболонці різних відділів шлунково-кишкового і урогенітального трактів. *Bifidobacterium bifidum* 79-12 має середню адгезивність. Адгезивність – один з факторів, що визначає взаємовідносини мікроорганізму і його хазяїна у екологічній ніші. Від адгезивної здатності мікроорганізму багато в чому залежить склад, стабільність і захисні властивості мікрофлори організму – хазяїна. Біфідобактерії розмножуються поділом перегородкою [24].

2.5. Таксономічний статус

Bifidobacterium bifidum 79-12 відноситься до роду *Bifidobacterium*. Згідно класифікації, що подана у «Визначнику бактерій Бергі» (1997), бактерії роду *Bifidobakterium* віднесені до сімейства *Actinomycetaceae* 20 частини класу *Thallobacteria* (грампозитивні неспороутворюючі палички неправильної форми) відділу *Firmicutes* царства *Procaryotae* [28].

Але за аналізом 16S рРНК таксономічний статус *Bifidobacterium bifidum* був змінений і зараз вона займає таке положення [30]:

- Домен: Бактерії
- Тип: *Firmicutes*
- Клас: *Actimobacteria*
- Порядок: *Bifidobacteriales*
- Родина: *Bifidobacteriaceae*
- Рід: *Bifidobacterium*
- Вид: *bifidum.*

2.6 **Удосконалення виробництва таблетованих форм Біфідобактерину**

Сьогоденне вирішення проблеми дисбактеріозу здійснюється двома шляхами – профілактики та лікування. В обох випадках велику роль компонентів відновлювання мікрофлори відіграють пробіотичні культури з певними властивостями, такі як лакто- та біфідобактерії, пропіонові бактерії та інші. Проте до мікроорганізмів, що використовуються як основа пробіотиків, висуваються певні вимоги: вони не повинні викликати побічні ефекти, зберігатися в травневому тракті до досягнення максимальної позитивної дії, тобто бути стійкими до значень pH шлунку; повинні мати високу швидкість росту та розмноження в умовах, близьких до умов, близьких до кишкового тракту; під час культивування in vitro для накопичення біомаси слід створювати умови, максимально наближені до середовища кишкового тракту [1, 2].

На основі аналізу літератури для вирішення цієї проблеми транспорту біфідобактерину **запропоновано замість біфідумбактерину в формі порошку використовувати біфідумбактерин в таблетованій формі.**

Таблетки як лікарська форма набули широкого поширення в усьому світі. На сьогодні таблетовані препарати складають понад три чверті від загального обсягу готових лікарських засобів. Позитивні якості таблеток забезпечують:

належний рівень механізації на основних стадіях і операціях, що забезпечує високу продуктивність, чистоту і гігієнічність виробництва цих лікарських форм;

точність дозування лікарських речовин, що входять у таблетку;

портативність таблеток, що забезпечує зручність їх відпускання, зберігання і транспортування;

тривала цілісність лікарських речовин у спресованому стані;

для речовин недостатньо стійких — можливість нанесення захисних оболонок;

можливість маскування неприємних органолептичних властивостей (смак, запах, забарвлення), що досягається нанесенням покриттів;

поєднання лікарських властивостей, несумісних за фізико-хімічними властивостями в інших лікарських формах;

локалізація дії лікарської речовини у певному відділі шлунково-кишкового тракту нанесенням оболонок, розчинних у кислому або лужному середовищі;

пролонгування дії лікарських речовин (нанесенням певних покриттів, використанням спеціальної технології і складу таблеток-ядер);

регулювання послідовного всмоктування декількох лікарських речовин із таблетки у визначені проміжки часу (багатошарові таблетки);

запобігання помилок при відпусканні і прийманні ліків завдяки нанесенню на поверхні таблеток відповідних написів.

Однак таблетки мають і деякі вади:

дія лікарських препаратів у таблетках розвивається відносно повільно;

таблетку неможливо ввести при блюванні і непритомному стані;

при зберіганні таблетки можуть цементуватися, при цьому збільшується час розкладання;

до складу таблеток можуть входити допоміжні речовини, що не мають терапевтичної цінності, а іноді спричиняють деякі побічні явища (наприклад, тальк подразнює слизову оболонку шлунка);

окремі лікарські препарати (наприклад натрію або калію бромід) утворюють у зоні розчинення висококонцентровані розчини, які можуть спричиняти сильне подразнення слизових оболонок (ця вада усувається розчиненням таблеток у відповідній кількості води);

не всі хворі, особливо діти, можуть легко проковтувати таблетки.

За способом одержання в промислових умовах розрізняють два класи таблеток:

1. Пресовані, які одержують шляхом пресування лікарських порошків на таблеткових машинах з різною продуктивністю. Цей спосіб є основним.

2. Формовані, або тритураційні таблетки, які одержують формуванням таблетованої маси. Тритураційні таблетки містять невеликі дози лікарських речовин і наповнювачів: їхня маса може становити до 0,05 г.

Таблетки класифікують також за конструктивою ознакою:

1. За складом: прості (однокомпонентні) і складні (багатокомпонентні).

2. За структурою будови: каркасні, одношарові і багатошарові (не менше двох шарів), із покриттям або без нього.

Каркасні (або скелетні) таблетки мають нерозчинний каркас, порожнини якого заповнені лікарською речовиною. Окрема таблетка являє собою немов губку, просочену ліками. При прийманні каркас її не розчиняється, зберігаючи свою геометричну форму, а лікарська речовина дифундує в шлунково-кишковий тракт.

Одношарові таблетки складаються із пресованої суміші лікарських і допоміжних речовин і однорідні у всьому об’ємі лікарської форми. У багатошарових таблетках лікарські речовини розташовуються пошарово.

При виготовленні лікарських форм із порошкового матеріалу, крім змішування та пресування, проводяться операції подрібнення, грануляції й таблетування.

На сьогодні відомо два основні методи одержання таблеток: прямим пресуванням речовин і через гранулювання.

Метод прямого пресування має деякі переваги. Він дозволяє досягти високої продуктивності праці, значно скоротити час технологічного циклу за рахунок ліквідації деяких операцій і стадій, виключити використання декількох позицій обладнання, зменшити виробничі площі, знизити енерго- і працезатрати.

Пряме пресування дає можливість одержати таблетки з волого-,термолабільних і несумісних речовин. Нині за цим методом одержують менше 20 найменувань таблеток. Це пояснюється тим, що більшість лікарських речовин не мають властивостей, які забезпечують безпосереднє їх пресування.

До цих властивостей належать: ізодіаметрична форма кристалів, добра сипкість (плинність) і спресовуваність, низька адгезійна здатність до прес-інструмента таблеткової машини.

Пряме пресування — це сукупність різних технологічних заходів, що дозволяють поліпшити основні технологічні властивості таблетованого матеріалу: сипкість і спресовуваність — і одержати з нього таблетки, минаючи стадію грануляції.

При прямому таблетуванні рекомендована мальтоза як речовина, яка забезпечує рівномірну швидкість засипання і має незначну гігроскопічність. Так само застосовують суміш лактози і зшитого полівінілпіролідону. Технологія виготовлення таблеток полягає в тому, що лікарські препарати ретельно змішують із необхідною кількістю допоміжних речовин і пресують на таблеткових машинах. Вади цього способу — можливість розшаровування таблетованої маси, зміна дозування під час пресування з незначною кількістю діючих речовин і використання високого тиску. Деякі з цих вад зводяться до мінімуму при таблетуванні примусовою подачею речовин, що пресуються, в матрицю. Здійснюють деякі конструктивні заміни деталей машини, тобто вібрацію башмака, поворот матриці на певний кут в процесі пресування, встановлення в завантажувальний бункер зіркоподібних мішалок різних конструкцій, засмоктування матеріалу в матричний отвір за допомогою вакууму, що створюється сам по собі, або спеціальним сполученням з вакуумлінією.

Але, незважаючи на досягнуті успіхи в галузі прямого пресування, у виробництві таблеток цей метод застосовується для обмеженої кількості лікарських речовин.

В даному дипломному проекті для виробництва таблеток Дибазол-Дарниця по 0,02 г №10 використовується метод сухої та вологої грануляції.

Гранулювання — цілеспрямоване укрупнення частинок, тобто — процес перетворення порошкоподібного матеріалу в зерна певної величини.

Грануляція необхідна для поліпшення сипкості таблетованої маси, яке відбувається внаслідок значного зменшення сумарної поверхні частинок при їх злипанні в гранули і, отже, зменшення тертя, що виникає між цими частинками під час руху.

Існуючі на сьогодні способи грануляції поділяють на такі основні типи:

1) суха грануляція, або гранулювання розмеленням;

2) волога грануляція, або гранулювання продавленням;

3) структурна грануляція.

Метод сухого гранулювання. Полягає в перемішуванні порошків і їх зволоженні розчинами склеювальних речовин в емальованих змішувачах з подальшим висушуванням до грудкуватої маси.

Зараз при сухому методі гранулювання до складу таблетованої маси порошків уводять сухі клейкі речовини (наприклад мікрокристалічну целюлозу, поліетиленоксид), які забезпечують під тиском зчеплення частинок, як гідрофільних, так і гідрофобних речовин.

Метод вологого гранулювання. Цьому способу гранулювання піддаються порошки, що мають погану сипкість і недостатню здатність до зчеплення між частинками. В обох випадках у масу додають клейкий розчин, який поліпшує зчеплення між частинками.

Стадія вологого гранулювання включає такі операції:

1) змішування порошків;

2) зволоження порошків розчином зв’язувальних речовині перемішування;

3) гранулювання вологої маси;

4) висушування вологих гранул;

5) обробка сухих гранул.

Змішування порошків. Здійснюється з метою досягнення однорідної маси і рівномірності розподілу діючої речовини таблеток. Для змішування і зволоження порошкоподібних речовин застосовують змішувачі різних конструкцій: з обертовими лопатями; шнекові; змішувальні барабани.

Волога маса гранулюється на спеціальних машинах-грануляторах, принцип роботи яких полягає в тому, що матеріал протирається лопатями, пружними валиками або іншими пристроями через перфорований циліндр або сітку.

При сушінні вологих гранул або при виробництві таблеток використовують різні типи сушарок: сушарки з полицями, що функціонують на примусовій циркуляції повітря; а у разі потреби регенерувати рідину, яка міститься в матеріалах, - сушарки із силікагельною колонкою, в яких повітря пропускається через силікагель; ІЧ-сушарки, в яких як термовипромінювачі використовують спеціальні дзеркальні лампи, нехромові спіралі розжарювання. В останні роки у промисловості застосовують спосіб висушування матеріалів у замороженому стані у вакуумі – так звані сублімаційні сушарки. Його застосування дозволяє зберігати основні біологічні якості матеріалу, що висушується. При цьому відбувається випарювання твердого тіла без плавлення, минаючи рідку фазу. Існують сушарки з псевдозрідженим шаром. Основними їх перевагами є: висока інтенсивність процесу; зменшення питомих енергетичних витрат; можливість повної автоматизації процесу.

У процесі сушіння гранул можливе їх злипання в окремі грудки. Для забезпечення рівномірного фракційного складу висушені гранули пропускають через гранулятори, що значною мірою забезпечує сталу масу таблеток.

В даному дипломному проекті для забезпечення рівномірного фракційного складу висушені гранули пропускають через вбудований змішувач– гранулятор калібратор GS1800. Виробник: фірма «Glatt», Німеччина.

Після цього гранули опудрюють, додаючи антифрикційні речовини, і передають на стадію таблетування.

Висушені гранули перед пресуванням повинні мати певну вологість, яка називається залишковою. Залишкова вологість для кожного таблеткового матеріалу індивідуальна і повинна бути оптимальною, тобто такою, при якій процес пресування відбувається найкраще, а якість таблеток відповідає вимогам ДФУ.

Пресування на таблеткових машинах здійснюється прес-інструментом, який складається із матриці та двох пуансонів.

Основними типами таблеткових машин являються ексцентрикові, або ударні, та ротаційні.

На стадії таблетування використовується роторна таблеткова машина Маріупольського заводу технологічного обладнання медичної промисловості. із вбудованим в неї пристроєм знепилення. Даний автомат дозволяє запобігати операцію знепилення, яка призводить до великих втрат сировини, запиленості приміщення та збільшує швидкість технологічного процесу виробництва таблеток.

На стадії фасування та пакування лікарського препарату використовують апарат для пакування таблеток в пачку ВА 100, фірми «Marchezini», Італія .

Контроль якості таблеток. Однією з основних умов промислового виробництва таблеток – відповідність готової продукції вимогам діючої нормативно-технічної документації. Якість таблеток визначається різними показниками, які поділяються на групи:

Органолептичні.

Фізичні.

Хімічні.

Бактеріологічні.

Біологічні.

До фізичних показників якості відносяться геометричні (форма таблетки, геометричний вид поверхні, відношення товщини таблетки до її діаметра) й власне фізичні показники (маса таблетки, відхилення від заданої величини маси, показники міцності, пористості, об’ємної густини, а також показники

зовнішнього виду – забарвленість, плямистість, цілісність, наявність написів або знаків, відсутність металічних включень).

До хімічних показників відносяться: розпадання, розчинність, сталість хімічного складу, активність лікарської речовини, термін придатності таблеток, їх стабільність при зберіганні.

До бактеріологічних показників якості відносяться наявність мікроорганізмів, спор і бактерій непатогенного характеру із вмістом їх не більше встановленої кількості.

Контроль якості готових таблеток проводять відповідно до вимог фармакопейної статті «Таблетки», а також приватних фармакопейних статей за наступними показниками:

органолептичні властивості;

механічна міцність;

розпадання;

розчинність;

середня маса таблеток і відхилення в масі окремих таблеток;

вміст лікарських речовин у таблетках;

однорідність дозування.

Якість готової продукції безпосередньо залежить від вимог GMP до сучасного обладнання. Приміщення й обладнання слід розташовувати, проектувати, конструювати, пристосувати й експлуатувати таким чином, щоб вони відповідали операціям, що проводяться. Їхнє розташування і конструкція повинні звести до мінімуму ризик помилок і забезпечувати можливість ефективного очищення й обслуговування з метою недопущення перехресної контамінації, накопичення пилу або бруду і взагалі будь-яких несприятливих чинників для якості продукції.

Обладнання, яке застосовується у виробництві, переробці, пакування лікарських засобів повинне бути:

відповідної конструкції (дизайну);

адекватного розміру;

зручно сконструйоване для виконання технологічної операції, для якої воно призначене;

зручним для його очищення (CIP/SIP) й експлуатації.

Ефективність устаткування в понятті якості продукту починається при його конструюванні. Коли розглядаються кілька моделей того самого устаткування варто звернути увагу на наступне:

операційні процедури повинні бути адекватні процесу ;

зручність заміни частин і обслуговування;

фактори навколишнього середовища;

кваліфікація й валідація;

конструкційний матеріал.

Це дасть можливість покращити і удосконалити процес виробництва, підвищити якість готового продукту, його конкурентоздатність, збільшити попит на нього, знизити ризик контамінації, збільшити об’єм випуску, зменшити частку ручної праці і час технологічного процесу

Технічне переоснащення процесу виробництва таблеток «Дибазол-Дарниця» зумовлене рядом недоліків старого обладнання:

велике пилоутворення;

швидке стирання прес-інструменту;

ручна загрузка;

неавтоматизоване управління;

не підлягає валідації;

підвищений ризик контамінації.

З метою запобігання цих явищ, була проведена заміна таблетпресу Маріупольського заводу технологічного обладнання медичної промисловості на таблетпрес Kilian S 250,який має ряд переваг (таблиця 3.1).

Таблетпрес призначений для здійснення процесу таблетування порошкоподібних або гранульованих матеріалів. Процес таблетування здійснюється шляхом синхронного руху ротора із встановленими матрицями та

пуансонів, завдяки чому кожна пара пуансонів потрапляє у відповідні заповнені порошком матриці.

Для заповнення матриць нижній пуансон опускається в своє нижнє положення і далі маса, що таблетується подається в матриці з використанням спеціальної установки наповнення безперервної дії. Кількість заповнення визначає нижній пуансон, поверненням в заповнену матрицю. Після установки наповнення в матрицю опускається верхній пуансон.

Якщо, при здійсненні процесу таблетування сила основного пресування вийшла за межі установленого діапазону, то такі таблетки автоматично відбраковуються за допомогою стисненого повітря.

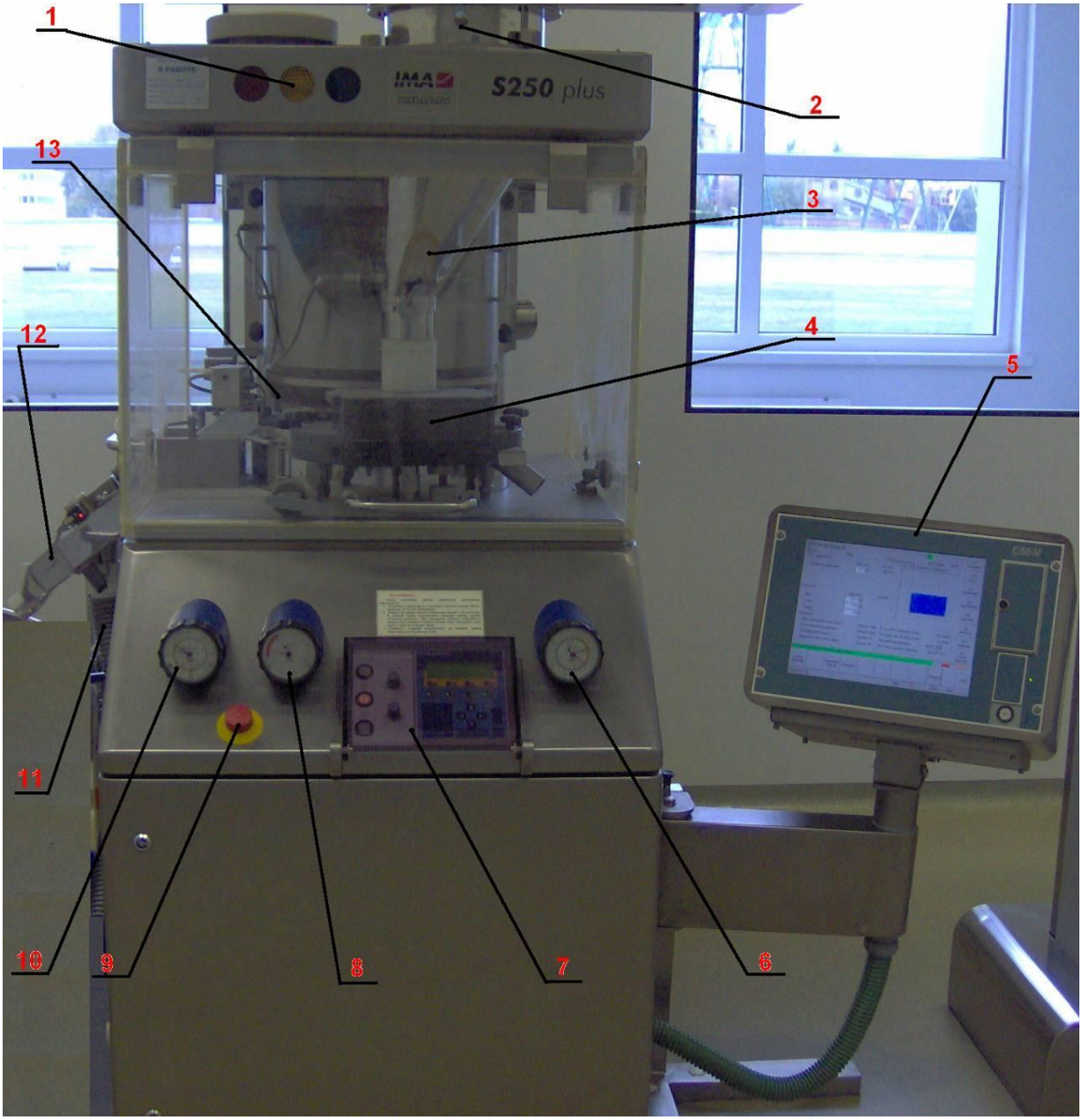

Рис. 3.1 Загальний вид таблеткового пресу KILLIAN S250.

1 – сигнальні лампи таблетпресу.

2 – з’єднувальний відрізок для подачі фармацевтичної маси із біну.

3 – завантажувальна воронка.

4 – пристрій наповнення

5 – панель управління таблеткового пресу C50V із сенсорним екраном.

6 – маховик для регулювання наповнення.

7 – панель управління таблеткового пресу OP7

8 – маховик для регулювання попереднього тиску.

9 – аварійна кнопка.

10 – маховик регулювання основного тиску.

11 – вихідний канал для відбракованих таблеток.

12 – вихідний канал для якісних таблеток.

13 – ротор таблеткового пресу.

Таблиця 3.1

Технічні характеристики таблеткового пресу		Значення параметрів
Електроенергія	Потужність, кВт	7,5
	Напруга	400В, 50Гц
	Сила струму, А	16
Відсос повітря із робочої зони таблетпресу	Витрата, $м^3$/год	360
Стиснене повітря	Тиск, бар	6
	Витрата, л/хв	6
Конфігурація пуансонів		
Кількість пуансонів		40
Тип пуансонів		EU-B

Тип матриці		BB
Діаметр матриці, мм		24,01
Висота матриці, мм		22,22
Максимальний діаметр таблетки, мм		13
Мінімальний діаметр таблетки, мм		6
Максимальне наповнення, мм		16
Максимальний основний тиск, кН		80
Максимальний попередній тиск, кН		28
Продуктивність	Мінімальна паспортна, табл/год	12000
	Мінімальна робоча, , табл/год	12000
	Максимальна паспортна, табл/год	270000
	Максимальна робоча, табл/год	200000

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Виробництвом пробіотика Біфідумбактерин займається невелика кількість фармацевтичних підприємств. Цей пробіотик виробляється в Україні та в деяких країнах СНД. На території України препарат виготовляють ВАТ «БІОФАРМА». Також Біфідумбактерин виробляється в Росії (понад 8 підприємств, з них найвідомішими є ОАО «Біомед», НПО «Мікроген», ООО «Фірма Фермент» і т.д.) [8].

Біфідумбактерин застосовується для лікування та профілактики дисбактеріозу, а також хронічних колітів. Тому для розрахунку річної потреби проаналізовано статистику саме цих захворювань на території України. Згідно даних наведених в медичних журналах, статтях та інтернетних джерелах загальна кількість людей, які страждають дисбактеріозом та колітами разом становлять приблизно 90 % [2,7]. Серед хворих, що дійсно лікуються і мають потребу в цьому препараті 30 % – немовлята та 20 % – дорослі. Враховуючи те, що населення України становить 42818389 чоловік, серед них – 505000 немовлят, можемо розрахувати кількість хворих. Немовлята – 151500, дорослі – 8462678. Отже, загальна кількість хворих – 8614178 чоловік.

Треба розрахувати необхідно кількість препарату для лікування дорослих та дітей. Курс лікування для дорослих становить по 5 доз × 2 – 3 рази до трьох неділь, для немовлят – по 3 дози × 2 рази 10 – 14 днів. Флакон вміщає в себе 5 доз. Тобто курс лікування для дорослих становить 63 флакони, а для немовлят 16 флаконів. Сумуємо і отримуємо 79 флаконів. Потрібна кількість флаконів на рік становить: 79 флаконів × 8614178 чоловік = 680520062 фл/рік.

На сьогоднішній день в країні склалася така ситуація, що торгівельні зв’язки з ринком Росії було порушено. Раніше в аптеках України приблизно 50% Біфідумбактерину було російського виробництва. Тому на даний час в Україні повинен збільшитися об’єм виробництва Біфідумбактерину майже в 2 рази. Також український Біфідумбактерин може себе зарекомендувати на ринку країн

та СНД (крім ринку Росії), тому для експорту треба збільшити виробництво на 20 %.

Отже, потрібна кількість флаконів на рік складає: 680520062 × 1,2 = 816624074 фл/рік.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Потрібна кількість флаконів на рік складає 816624074.

Продуктивність біологічного агента становить 2×10^9 КУО/мл. В 1 флаконі 1×10^7 КУО, тому об'єм потрібної кількості культуральної рідини (х) дорівнює:

$$x = \frac{816624074 \times 10^7 КУО}{200 \times 10^7 КУО} = 4083120{,}37\ мл$$

Враховуючи 10 % витрат культуральної рідини при виділенні біомаси, загальний її об'єм повинен становити: (4083120,37 × 110) / 100 = 4491432,5 мл. Отже, загальну кількість, яку потрібно виробити, складає 4491,4 л культуральної рідини.

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту і геометричного об'єму ферментера

Розрахуємо кількість циклів виробництва та об'єм необхідного ферментера: час культивування продуцента становить 48 год, тобто 2 доби. Враховуємо також ще 1 добу на підготовку обладнання для культивування. Тобто загальний час виробничого біосинтезу становитиме 3 доби. Кількість робочих днів по даному препарату буде становити 39 діб, тобто кількість циклів $N_{циклів}$ = (39 × 24) / 72 = 13 циклів. На один цикл кількість культуральної рідини становить 4491,4/13 = 350 л.

Враховуючи $К_з$ = 0,7 – об'єм ферментера відповідає 500 л.

Отже, згідно з розрахунку враховуючи всі витрати необхідно виготовляти 4491,4 л культуральної рідини. Для цього доцільно використовувати 13 циклів на рік враховуючи час, що необхідний для ферментації та час на підготовку

обладнання для ферментації. Тому для культивування обрано ферментер на 500 л з коефіцієнтом заповнення = 0,7, робочий об’єм якого становить $V_р$ = 350 л.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробниче культивування для накопичення біомаси *B. bifidum* здійснюють в 500 л ферментері з коефіцієнтом заповнення 0,7. Робочий об’єм ферментера становить:

$$V_{роб} = 500 \times 0,7 = 350 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об’єму поживного середовища. Отже, для одержання 350 л культуральної рідини потрібно:

$$V_{роб.1} = 350 \times 0,1 = 35 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування у інокуляторі об’ємом 50 л з коефіцієнтом заповнення 0,7.

Для засіву інокулятора для одержання 35 л культуральної рідини необхідно:

$$V_{роб.2} = 35 \times 0,1 = 3,5 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об’ємом 5 л з коефіцієнтом заповнення 0,7.

Для одержання 3,5 л культуральної рідини потрібно напрацювати:

$$V_{роб.3} = 3,5 \times 0,1 = 0,35 \text{ л} = 350 \text{ мл посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати при культивуванні у колбах.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого культивування *Bifidobacterium bifidum* у 500 л ферментері з коефіцієнтом заповнення 0,7 буде проходити у 3 етапи.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Лактоза являється компонентом поживного середовища, для вирощування штама *Bifidobacterium bifidum*, що містить у своєму складі молочний цукор (лактозу). Лактоза являє собою дисахарид, який перш ніж катаболізуватися, повинен бути розщеплений на глюкозу та галактозу (фермент β-галактозидаза). Тому можна зробити висновок, що джерелом вуглецю та енергії для біологічного агента виступає лактоза.

Bifidobacterium bifidum є гомоферментативною молочнокислою бактерією, тому, відповідно, здійснює гомоферментативне молочнокисле бродіння. Лактоза катаболізується за гліколітичним шляхом. Водень, який відщеплюється під час дегідрування гліцеральдегід-3-фосфату у вигляді НАДН, передається на піруват. У присутності лактатдегідрогенази (КФ.1.1.1.27) піруват відновлюється до лактату. Лише невелика кількість пірувату декарбоксилюється та перетворюється на оцтову кислоту, етанол і CO_2, а також ацетоїн [42].

Згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes та як уже вказано вище, катаболізм лактози у *Bifidobacterium bifidum* відбувається за гліколітичним шляхом, про що свідчить наявність відповідного ключового ферменту 6-фосфофруктокінази 1 (КФ.2.7.1.11). Перетворення α-D-глюкозо-1-фосфату на α-D-глюкозо-6-фосфат відбувається за участю ферменту фосфоглюкомутази (КФ.5.4.2.2). Взаємне перетворення α-D-глюкозо-6-фосфату, β-D-фруктозо-6-фосфату і β-D-глюкозо-6-фосфату катаболізується ферментом глюкозо-6-фосфатізомеразою (КФ.5.3.1.9). Фермент фруктозобіфосфатальдолаза (КФ.4.1.2.13) перетворює β-D-фруктозо-1,6-дифосфат на дві сполуки:

гліцеральдегід-3-фосфат та дигідроксиацетонфосфат. Подальше перетворення до фосфоенолпірувату відбувається за рахунок ферменту енолази (КФ.4.2.1.11). Схема катаболізму лактози за шляхом Ембдена – Майєргофа – Парнаса (гліколіз) наведено на *рис. 4.1.*

Заключною реакцією гліколізу є перетворення фосфоенолпірувату на піруват, що в свою чергу катаболізується піруваткіназою (КФ.2.7.1.40) [41].

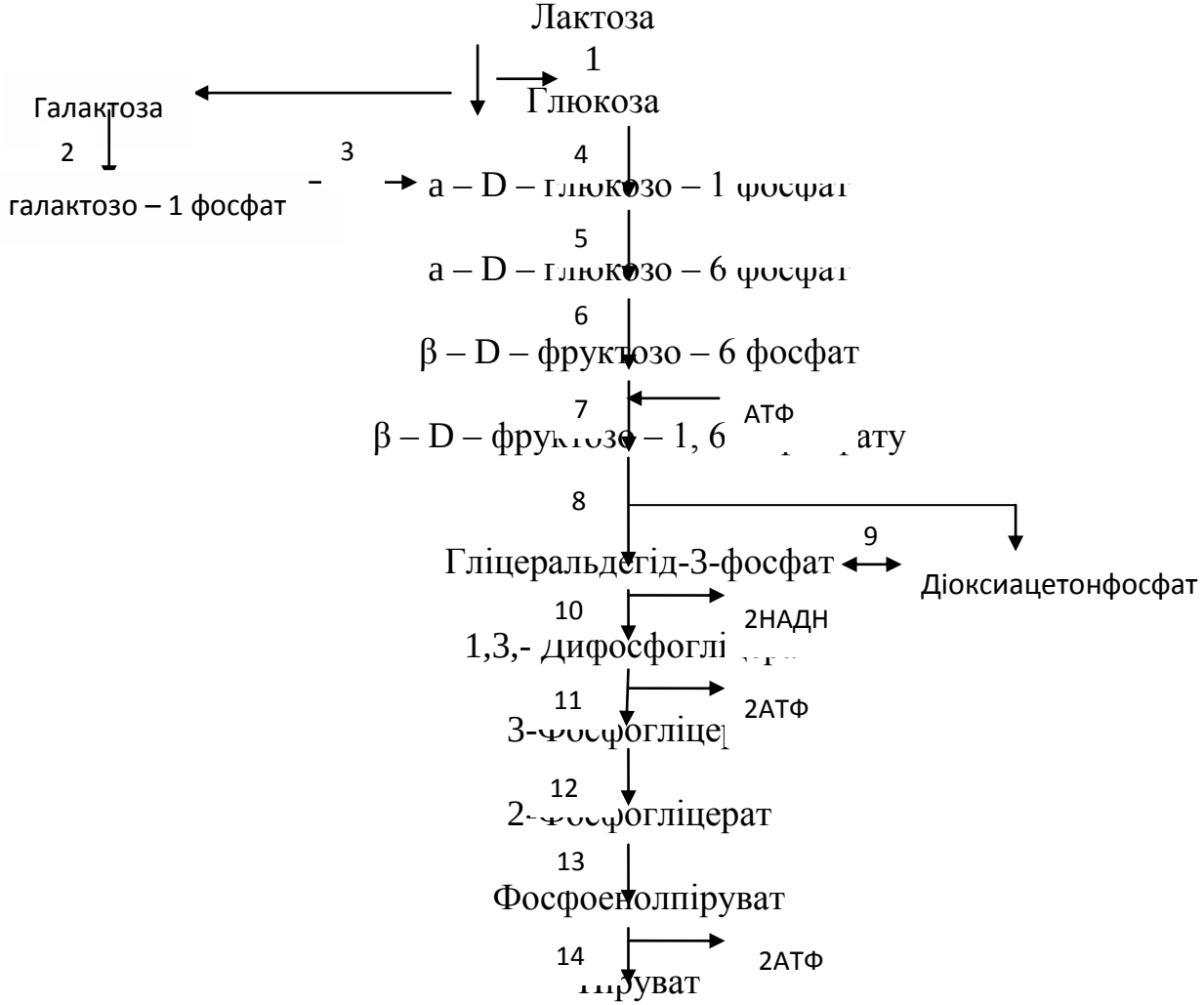

Рис. 4.1. **Катаболізм лактози *Bifidobacterium bifidum* за гліколітичним шляхом**

У наведеному на *рис. 4.1.* шляху функціонують такі ферменти: 1 – β-галактозидаза; 2 – галактокіназа; 3 – галактозо-1-фосфат-уридилтрансфераза; 4 – гексокіназа;5 – фосфоглюкомутаза (КФ. 5.4.2.2); 6 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ. 5.3.1.9); 7 – фруктозо-1,6-дифосфат (КФ.3.1.3.11) та 6-фосфофруктокіназа (КФ. 2.7.1.11); 8 – фруктозодифосфатальдолаза (КФ. 4.1.2.13); 9 – триозофосфатізомераза (КФ. 5.3.1.1.); 10 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ. 1.2.1.12); 11 – фосфогліцераткіназа (КФ. 2.7.2.3.); 12 – фосфогліцератмутаза (К.Ф. 5.4.2.12); 13 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 14 – піруваткіназа (КФ. 2.7.1.40) [43].

Далі піруват залучається до метаболізму за участю таких ферментів: піруватдегідрогенази (КФ. 1.2.4.1), дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ. 1.8.1.4) та лактатдегідрогенази (КФ. 1.1.1.27).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Ензимологічні дослідження показали, що *Bifidobacterium bifidum* 79-12 не мають ключового гліколітичного ферменту фруктозодифосфатальдолази, і тому катаболізм вуглеводів здійснюється у пентозофосфатному циклі. Глюкоза перетворюється на фруктозо-6-фосфат за гліколітичним шляхом, а потім за допомогою активних фосфокетолаз перетворюється на ацетилфосфат і ксилулозо-5-фосфат, останній в свою чергу дає ацетилфосфат і гліцеральдегідфосфат [29].

Біфідобактерії відносяться до грампозитивних мікроорганізмів. Тому для отримання препаратів на основі біомаси *Bifidumbacterium bifidum* 79-12 повинні синтезуватись такі основні компоненти клітини [28]:

- білки;
- ліпіди;
- полісахариди;
- нуклеїнові кислоти;
- тейхоєві кислоти.

Амінокислоти синтезуються з наступних попередників: піруват, оксалоацетат, 2-оксоглутарат і з хоризмату – ароматичні амінокислоти[29].

До складу клітин біфідобактерій входять фосфоліпіди.

Жирні кислоти синтезуються з Ацетил-КоА. КоА-похідні не є субстратами ферментів, що беруть участь у синтезі жирних кислот, замість них використовується ацилпереносний білок (АПБ), який є схожим на кофермент А [29].

УДФ-N-ацетилмурамова кислота та УДФ-N-ацетилглюкозамін – попередники пептидоглікану (який може складати від 50 до 95% всієї маси стінки клітин) – синтезуються з глюкозамін-6-фосфату[29].

Другим попередником фосфоліпід є діоксиацетонфосфат, з якого синтезується фосфатидсерин.

Біосинтез піримідинових нуклеотидів є карбамоїлфосфат та аспартат. Рибозо-5-фосфат, утворений у пентозофосфатному циклі, активується перетворенням у 5-фосфорибозил-1-пірофосфат. Реакція 5-фосфорибозил-1-пірофосфату з ортоатом дає оротидинмонофосфат, який далі декарбосилюється в уродинмонофосфат[29].

Пуринові нуклеотиди починають синтезуватись з 5 – фосфорибозил-1-пірофосфату, утворюється імідазольний нуклеотид. Три атоми піримідинового кільця, необхідні для утворення пуринового кільця з імідазольного нуклеотиду, надходять із бікарбонату, аспартату та фомілтетрагідрофолієвої кислоти. Замикання кільця дає інозинмонофосфат (пуриновий нуклеотид, ІМФ). Додаткові реакції приводять від ІМФ до АМФ або до ГМФ, і утворюється АТФ та ГТФ [29].

Тейхоєві кислоти у складі клітинної стінки біфідобактерій можуть складати до 50%. Синтез їх починається з ксилулозо-6-фосфату,з якого синтезується діоксиацетон, а з діоксиацетону в свою чергу – 3фосфогліцерин. 3-фосфогліцерин є вихідною сполукою для синтезу тейхоєвих кислот [28].

Схема біотрансформації наведена (рис. 4.5.)

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Біологічний агент по відношенню до кисню є облігатним анаеробом. Для вирощування першої генерації в колбах необхідно створити анаеробні умови.

Для проведення процесу основного біосинтезу необхідно обрати біореактор, який зможе задовольнити усі потреби культури.

Процес біосинтезу буде здійснюватись у біореакторі з механічним перемішуванням. Оскільки біфідобактерії є анаеробами, тому не потрібна система подавання повітря та піногасника в аппарат. У зв’язку з меншою інтенсивністю біохімічних процесів і зменшеним тепловиділенням також спрощується система тепловідводу. Анаеробний біореактор має підводи для посівного матеріалу, поживних середовищ, пари, води, відводи продуктів ферментації, газів що виділяються.

Згідно розрахунків, об´єм культуральної рідини становить 35 літрів. Беручи до уваги те, що процес біосинтезу не потребує подачі повітря, а також має дуже малу ефективність перемішування, можемо обрати коефіцієнт заповнення 0,7. Враховуючи це, геометричний об´єм ферментера становить 50 літрів.

"Відкрита" конструкція виконавчого блоку забезпечує швидкий доступ, легке обслуговування і зручну роботу з ферментері.

Реактор з рубашкою виготовлені з нержавіючої сталі і мають спіральний нагрівальний елемент, призначений для ефективного і

однорідного нагрівання. Відношення висоти ємності до її діаметра становить 3:1. Це добре співвідноситься зі стратегією масштабованості. Biostat ® D 50 поставляється з цифровою системою вимірювання та управління параметрами процесу, датчиками температури, pH, pO_2 і чотирма вбудованими перистальтичними насосами.

Блок управління ферментаційної системи виготовлений з нержавіючої сталі, і містить всі необхідні компоненти, перетворювач частоти, клапани та потужну цифрову систему вимірювання та управління Використання цієї системи дозволяє досягти більш високої надійності роботи системи.

Функціональні можливості програмного забезпечення ферментера дозволяють проводити вимірювання параметрів процесу, автоматичне калібрування і управляти замкнутими робочими циклами. У стандартне оснащення входить система стерилізації реактора, що включає в себе впускні і випускні повітряні фільтри.

Ергономічний користувальницький інтерфейс в поєднанні з надійною, функціонально-орієнтованої структурою меню, гарантує мінімальне навчання і легку роботу.

У даному випадку оптимальним буде періодичне культивування *B. bifidum* оскільки забезпечити строго асептичні умови під час безперервного культивування неможливо.

Для підготовки посівного матеріалу та виробничого культивування обрано інокулятори та ферментер компанії Sartorius Stedim Systems (Німеччина) [10]. Ця фірма випускає промислові ферментери серії BIOSTAT D-DCU об’ємом від 10 л до 30 $м^3$. Рамна конструкція з нержавіючої сталі забезпечує простоту в обслуговуванні. Контроль показників pH, оптичної густини, температури, швидкості обертання мішалки здійснює вбудований блок управління. Промислову систему можна створювати з урахуванням усіх побажань і вимог.

Отже, для культивування *B. bifidum* з метою отримання Біфідумбактерину в промислових масштабах обрано наступні апарати компанії Sartorius Stedim

Systems: ферментер BIOSTAT D-DCU об’ємом 500 л, посівний апарат, об'ємом 50 л та інокулятор об’ємом 5 л.

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Оскільки біфідобактерії є анаеробами, тому не потрібна система подавання повітря та піногасника в апарат.

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Дезінфекція – сукупність способів повного, часткового або селективного знищення потенційно патогенних для людини мікроорганізмів на об’єктах зовнішнього середовища з метою розриву шляхів передачі збудників інфекційних захворювань від джерел інфекції до сприйнятливих людей [11].

Для санітарної обробки об’єктів підприємства допускається застосування дезінфікуючих та миючих з дезінфікуючим ефектом засобів, які в установленому порядку внесені в “Обліковий перелік дезінфекційних засобів в Україні”, з метою миття або дезінфекції об’єктів фармацевтичної промисловості.

Дезінфекція та миття виробничих приміщень має важливе значення на фармацевтичному виробництві. На фармацевтичних підприємствах панелі, стіни, двері виробничих приміщень щодня необхідно протирати вологими ганчірками, змоченими дезінфікуючим та миючим засобами. Особливо треба ретельно протирати ручки і нижні частини дверей. Мити підлогу. Обладнання, аппаратура і інвентар, поверхня яких забруднюється в процесі роботи мастилом, потрібно відразу промити гарячою водою (70 – 80°С), а потім дезінфікувати.

Персонал є одним з основних джерел забруднення готового продукту мікроорганізмами. Для миття рук використовують рідке або туалетне мило, миють руки під краном. Витирають руки досуха стерильною серветко. Потім персонал обробляє руки розчином дезінфікуючого засобу, призначеного для

обробки рук, для цього можна використати розчин дегміну 1 %; 2,4 % розчин рецептури “С-4” (суміш розчину перекису водню і мурашиної кислоти).

Дезінфікуючі засоби чергують кожні 5 – 6 днів для запобігання появи стійких форм мікроорганізмів [11].

Миючі та дезінфікуючі засоби повинні відповідати таким вимогам:

- виражені миючі властивості (миюча здатність не менше 90,0%);
- виражена дезінфікуюча здатність (не менше 90,0%);
- повне змочування поверхонь із різних конструктивних матеріалів;
- низька агресивність по відношенню до конструктивних матеріалів, призначених для виготовлення технологічного обладнання, комунікацій, інвентаря;
- повне змивання з робочих поверхонь об’єктів підприємства при мінімальних втратах води вироблюваної продукції.

Для санітарної підготовки виробничих приміщень можуть використовуватись такі дезінфікуючі засоби:

Гембар. ТУУ21643506.002-01. Активно діюча речовина – гуанідинова полімерна сполука, що є синтетичним аналогом природних гуанідинових сполук. Не містить лугу, альдегиду, фенолу, окислювальних і хлорпохідних сполук. Препарат являє собою прозору безбарвну рідину та не має запаху. Препарат має пролонговану бактерицидну, фунгицидну, віруліцидну дію. Інактивує мікроби, у тому числі туберкульозу, грибки, віруси, у тому числі повно-, адено-, гепатиту Б, герпеса, енцефалітний, грипу, ВІЛ.

Використовують для поточної, заключної і профілактичної, дезінфекції поверхонь, інвентарю і посуду. Препарат не токсичний, має широкий спектр дії та високу біологічну активність. Активність препарату мало змінюється під впливом різних умов зовнішнього середовища. Гембар не леткий, що дозволяє проводити дезінфекцію в присутності людей, а обслуговуючому персоналу при роботі з робочими розчинами не застосовувати традиційних засобів індивідуального захисту очей і слизових оболонок.

Також важливо зазначити, що препарат Гембар нетоксичний, не має алергійних, шкірно-дратівних і шкірно-резорбтивними властивостей та різних побічних ефектів.

Розчин Гембару готують 0,25 % концентрації, для цього 2,5 г концентрату гембару розбавляють 1 літром води.

Ціна Гембару – 160 грн/л [12].

Дезактин. Хлорвмісний препарат, який містить (%): дихлорантин - 21,0-23,0; 5,5-диметилгідантоїн - 12,4-16,4; диспергатор - 9,0-12,0; аніонні поверхнево-активніречовини - 3,2-5,0; інгібітор корозії до 10,0; наповнювач до 100,0. Вміст активного хлору не менше 14%. Препарат являє собою порошок від білого до жовтуватого кольору з помірним запахом хлору.

Використовують для дезінфекції та очистки поверхонь всіх видів, для дезінфекції перед стерилізаційної очистки, медичних інструментів. Має миючі властивості. Використовується в лікувально-профілактичних, дитячих, медичних лабораторіях, на підприємствах харчової, косметичної, фармацевтичної, мікробіологічної промисловості.

Володіє бактерицидною, віруліцидною та фунгіцидною дією.

Розчин Дезактину готують 0,2 % концентрації, для цього 2 г порошку дезактину розбавляють 1 літром води.

Ціна Дезактину – 140 грн/кг [13].

Біомой. ТУ У 22902465.005-96. Багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб з дезінфікуючим ефектом.

Біомой являє собою порошок білого кольору, який має помірний запах використаної сировини.

Застосування Біомою: передстерилізаційне очищення і миття виробів медичного призначення з металу, скла, полімерів та гуми, включаючи жорсткі та гнучкі ендоскопи. Відмінно розкладає білок крові. При цьому не потрібно застосування в комплексі з ним перекису водню; миття і дезінфекція різноманітного технологічного обладнання, інвентарю, комунікацій і тари (особливо відмінно миє склотару) на підприємствах харчової та молочної

промисловості, на підприємствах з виробництва пива, алкогольних і безалкогольних напоїв, фармацевтичних та мікробіологічних.

Для миття використовують 0,5 % розчин Біомою. Приготування: 5 г концентрату Біомою розбавляють 1 літром води.

Ціна Біомою – 48 грн/кг [14].

Хлорантоін. ТУ У 22902465.004-95. Хлоративний, багатокомпо-нентний, поліфункціональний дезінфекційний засіб з миючим ефектом.

Препарат являє собою: сипучий порошок, світлих тонів зі слабким запахом хлору. Хлорантоін – дезінфекційний засіб з миючим ефектом стабільний при зберіганні протягом 3-х років. Розчинність у воді – не менше20 г/дм^3. Водні розчини Хлорантоіну прозорі, безбарвні, мають слабкий запах хлору. Допускається помірна опалесценція водних розчинів Хлорантоіну. Робочі розчини засобу мають миючі, дезінфікуючі та передстерилізаційні властивості, не ушкоджують об'єкти, виготовлені з металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу і поверхні медичних приладів і устаткування з лакофарбовими, гальванічними і полімерними покриттями, добре емульгують жири, видаляють білково-жирову плівку з оброблюваних поверхонь, легко з них змиваються, не залишаючи нальоту. Гомогенізують мокротиння та інші виділення.

Хлорантоін не сумісний з катіонними поверхнево-активними речовинами, а також,одно-і багатоатомними спиртами.

Хлорантоін має бактерицидні, туберкульозні, віруліцидні (включаючи збудника поліомієліту, всіх типів грипу, парагрипу, коронарної респіраторно-синцитіальних, ротавірусної, аденовірусної інфекцій, SARS, гепатитів, ВІЛ, вірусних гастроентеритів і інших), спороцидні та фунгіцидні (включаючи збудників кандидозів, дерматомікозів, цвілевих грибів) властивості. Крім того, Хлорантоін застосовується в осередках особливо небезпечних і зоонозних інфекцій (чума, холера, сибірська виразка і т.п.). Хлорантоін видаляє механічні білкові, жирові забруднення, залишки крові, залишки лікарських засобів із

зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів та порожнин виробів медичного призначення.

Робочий розчин Хлорантоіну готуютьу тарі будь-якого матеріалу, за винятком оцинкованого заліза, шляхом розчинення у 1 літрі води 2 г концентрату при перемішуванні протягом 1-2 хвилин.

Ціна Хлорантоіна – 125 грн/кг [15].

Дезосепт Форте. ТУ У 24.4-30906521-001-2000.Склад препарату: надоцтова кислота 15 - 20%, пероксид водню 15-25%, оцтова кислота 15- 25%. Препарат являє собою прозору безбарвну рідину, має помірний запах [16].

Препарат застосовується для дезінфекції різних видів технологічного обладнання (резервуарів, ємностей, теплообмінників, ліній розливу, упаковки і розфасовки), трубопроводів, інвентарю, тари, санітарно-побутових приміщень. Добре змішується з водою. Рекомендується використовувати для обладнання, виготовленого зі сталі, алюмінію, оцинкованого заліза, емалі, гуми.

Препарат має високу бактерицидну, віруліцидну, спороцидну та фунгіцидну дію. Сильна біоцидна та спороцидна дія обумовлена завдяки високій окислюючій здатності надоцтової кислоти, відсутність ефекту призвичаєння мікроорганізмів до препарату, швидкість і надійність мікробіологічної дії внаслідок специфічної високої швидкості дифузії надоцтової кислоти через кліткову мембрану.

Дезосепт Форте має широкий температурний інтервал застосування, в тому числі при низьких температурах, препарат на поверхні обладнання розкладається на нешкідливі продукти, залишки препарату легко та швидко змиваються водою. Продукти розкладу надоцтової кислоти – оцтова кислота, вода, кисень – не токсичні та не шкідливі, і не забруднюють навколишнього середовища.

Робочий 0,15 % розчин Дезосепт Форте готують у тарі будь-якого матеріалу, шляхом розчинення у 1 літрі води 15 мл концентрату при перемішуванні протягом 1-2 хвилин.

Ціна Дезосепт Форте – 128,5 грн/л [16].

Найбільш ефективним та економічним дезінфікуючим засобом можна вважати Гембар, але постійне використання Гембару неприйнятне, оскільки у мікроорганізмів може виникнути резистентність до цього ж засобу, тому часом треба буде його міняти або чергувати з іншим дезінфікуючим засобом.

Існує також багато дезінфікуючих засобів з миючим ефектом. Найпопулярнішими є Біомой, Тефлекс, Хімітек «Универсал-Дез», Хлорантоін, Дезосепт Форте.

Серед цих засобів можна обрати Біомой, Дезосепт Форте та Хлорантоін, тому що їхнє використання є ефективним, так як їхні дезінфікуючі властивості перевищують 90 %. Але Хлорантоін та Дезосепт Форте має відносно більшу ціну, майже в три рази дорожчий за Біомой.

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Особливістю технологій біфідовмісних пробіотиків є використання складних середовищ для вирощування біфідобактерій, а також необхідність забезпечення чітких анаеробних умов культивування, що значно ускладнює технологічний процес.

З огляду на фізіологічні потреби біфідобактерії є дуже вимогливими мікроорганізмами і потребують додаткових факторів росту. Ці бактерії мають потребу у вітамінах, амінокислотах, пептидах, пуринових і піримідинових сполуках, солях, ефірах жирних кислот, спеціальних ростових добавках [17].

Тому поживні середовища для культивування біфідобактерій містять багато компонентів і мають складний технологічний процес приготування і стерилізації.

Для культивування біфідобактерій використовується ряд складних поживних середовищ, які використовуються для культивування ще й молочнокислих бактерій, але деякі з них розроблені з врахуванням фізіолого-біохімічних особливостей бактерій роду *Bifidobacterium*.

Культивування штаму *B. bifidum* відбувається на гідролізатно – молочному середовищі, яке має наступний склад, г/л: пептон – 2,0; натрій хлористий – 2,0-3,0; цистин солянокислий – 0,1-0,15; лактоза – 10,0; гідролізат молока – 500 г. Виробничий біосинтез штаму *B.bifidum* здійснюється у ферментері об'ємом 5 $м^3$, що містить 2555,5 л поживного середовища. Одержання посівного матеріалу для штаму *B. bifidum* відбувається у 3 етапи: отримання посівного матеріалу, для засіву ферментера, у інокуляторі об'ємом 40 л, отримання інокуляту, для засіву, в інокуляторі об'ємом 4 та у 5 колбах об'ємом 750 мл.

Для проведення стерилізації потрібно розділити поживне середовище на композиції, оскільки воно має термостабільні та термолабільні компоненти, які не можна разом стерилізувати. Гідролізатно – молочне середовище має такі термолабільні компоненти, як пептон, гідролізат молока, лактоза та L - цистин солянокислий. Проаналізувавши склад гідролізатно – молочного середовища, поділимо його на композиції для стерилізації:

Композиція А: пептон, гідролізат молока, лактоза, L - цистин солянокислий (режим стерилізації 112°С протягом 40 хвилин).

Композиція Б: натрій хлористий (режим стерилізації 131 °С протягом 40 хвилин).

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Пози-ція	Позначення	Найменування	Кіль-кість	Примітка
1	**2**	**3**	**4**	**5**
РЗ-1	Реактор-змішувач для отримання робочого розчину Біомоя	Реактор-змішувач марки СМ500. Фірма «Станко Групп».	1	Реактор-змішувач об'ємом 8 $м^3$ з паровою сорочкою та мішалкою. Загальний об'єм 20 л, швидкість обертів мішалки 50-300 об/хв.
Д-2 Д-4 Д-10 Д-15 Д-18	Дозатор	Ваговий дозатор СВЕДА ДВС-301-70-1. Габарити 820х615х610 мм. Фірма ООО НПФ "Сведа, Лтд", Україна. Продуктивність 0,05 – 620 кг.	5	Об'ємно-ваговий дозатор
РЗ-3	Реактор-змішувач для отримання 6% розчину NaON	Реактор-змішувач марки СМ500. Фірма «Станко Групп».	1	Реактор-змішувач об'ємом 20 л оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 20 л, швидкість обертів мішалки 50-300 об/хв., сталь 12Х18Н10Т

РЗ-5 РЗ-11 РЗ-16	Реактор-змішувач для приготування композиції А, яка містить термолабільні компоненти	Реактор-змішувач марки СМ500. Фірма «Станко Групп». В залежності від типу продукту мішалку в середини апарату можна змінювати. Підігрів відбувається за допомогою металічних ТЕНів.	3	Реактор-змішувач оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Об'єми 30 л, 300 л та 3,2 $м^3$ відповідно. Швидкість обертів мішалки 50-300 об/хв., сталь 12Х18Н10Т
Н-6 Н-12 Н-17 Н-20	Магнітний насос	Насос MS1 потужність 120-7600 л/год, діаметр шлангу 4 см.	4	Насос з магнітною муфтою
ЗП-7	Засівний пристрій	Засівний бачок для внесення посівного матеріалу в інокулятор в стерильних умовах.	1	Нержавіюча сталь
Ф-8 Ф-13 Ф-21	Фільтр тонкої очистки	Фільтр для стерилізуючої фільтрації. Площа фільтрувального матеріалу 2,9 . Продуктивність – 1700 $м^3$/год.	3	Фільтруючий матеріал фторопласт
ФР-9	Ферментер	Ферментер марки BioFlo 510 об'ємом 40 л. Перемішування 100-700 об/хв.	1	Полірована нержавіюча сталь марки 316L.
ФР-14	Ферментер	Ферментер тип-Р. об'ємом 400 л. Фірма «Bioengineering», Швейцария. Перемішування макс. 750 об/хв. Максимальна температура 150^oC. Потужність привода 10 кВт. Габарити 1700× 2450× 245	1	Нержавіюча сталь марки 316L.
ФР-22	Ферментер	Ферментер Bioreactors 7 об'ємом 5 $м^3$. Фірми «APPLIKON BIOTECHNOLOGY».	1	Нержавіюча сталь марки 316L

Р3-19	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	Реактор-змішувач марки СМ500. Фірма «Станко Групп». В залежності від типу продукту мішалку в середини апарату можна змінювати. Підігрів відбувається за допомогою металічних ТЕНів.	1	Реактор-змішувач оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальний об’єм 20 л, швидкість обертів мішалки 50-300 об/хв., сталь 12Х18Н10Т
Ін-22	BIOSTAT D-DCU-50	Інокулятор. Циліндричний апарат з еліптичним днищем. Апарат з односекційною сорочкою, з трубою перетискування, з турбінною мішалкою. Містить 3 відбійні перегородки. Ємність 50 л. Потужність 1,5 кВт. Має клапан для відбору проб та механічний піногасник. Виробник Sartorius Stedim Systems (Німеччина).	1	Матеріал нержавіюча сталь 316L
Фр-23	BIOSTAT D-DCU-500	Ферментер. Циліндричний апарат з еліптичним днищем з верху привареною кришкою. Мішалка двохярусна, швидкість її обертання 3 $с^{-1}$. Апарат з нижнім зливом продукту. Містить 4 відбійні перегородки. Об'єм 500 л. Товщина стінки реактора 10 мм. Має клапан для відбору проб. Виробник: Sartorius Stedim Systems (Німеччина)	1	Матеріал нержавіюча сталь 316L

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

ДР 1.1.1 Навчання та інструктаж

На кожному біотехнологічному підприємстві, перед тим як допустити персонал до роботи, він проходить навчання та інструктаж. Інструктаж персоналу проводиться кожен рік. Під час навчання з персоналом детально обговорюють концепцію забезпечення якості продукції, підготовку та проведення технологічного процесу.

ДР 1.1.2 Санітарна підготовка персоналу

Під час влаштування на роботу персонал повинен проходити обовязковий меддогляд. Безпосередньо на виробництві персоналу проводять інструктаж, щодо дотримання правил гігієни та санітарно – гігігєнічних вимог. Перед початком роботи працівники повинні одягти чистий санітарний одяг, звязати та підібрати волосся під хустинку, зняти з прикраси, ретельно вимити руки з милом, і продезінфікувати їх.

ДР 1.2. Підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів

ДР 1.2.1. Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів для стін, підлоги, вікон та дверей

Для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей на виробництві застосовують Дезактин та Хлорантоїн. Дезінфікуючі засоби Дезактин та Хлорантоїн приходять на виробництво у вигляді концентратів в пластикових пляшках об’ємом 1 л.

ДР 1.2.1.1. Приготування робочого розчину Дезактину

Для приготування 1 л 0,2% робочого розчину необхідно 2 мл концентрату та 998 мл води питної. На 1 використання необхідно 7,2 л 0,2% робочого розчину Дезактину. У мірному стакані відмірямо 14,4 мл концентрату, виливаємо у ємність об'ємом 10 л, та додаємо 7185,6 мл питної води. Приготований робочий розчин Дезактину можна зберігати не більше 3 днів в щільно закритій тарі. Приготований робочий розчин Дезактину подають на стадію ДР 1.3.1.

ДР 1.2.1.2. Приготування робочого розчину Хлорантоїну

Для приготування 1 л 0,2 % робочого розчину необхідно 2 мл концентрату та 998 мл води питної. На одне використання необхідно приготувати 7,2 л робочого розчину. У мірному стакані відміряємо 14,4 мл концентрату Хлорантоїну, виливаємо у ємність об'ємом 10 л та додаємо 7185,6 мл питної води. Приготований 0,2% робочий розчин Хлорантоїну дозволяється зберігати 24 години в щільно закритій тарі. Приготований робочий розчин Хлорантоїну подають на стадію ДР 1.3.1.

ДР 1.2.2. Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів для обладнання, інвентарю та комунікацій

Для дезінфікування обладнання використовують 0,3 % робочий розчин Біомою. Дезінфікуючий засіб Біомой приходить на виробництво у вигляді концентрату в пластиковій пляшці об'ємом 1 л.

ДР 1.2.2.1. Приготування робочого розчину Біомою

Для приготування 1 л 0,3 % робочого розчину Біомою необхідно 3 мл концентрату та 997 мл води питної. Для одного циклу робити виробництва необхідно приготувати 8965 л засобу для миття та дезінфекції двох ферментерів на 5 $м^3$, двох посівних апаратів на 400 л, двох інокуляторів на 40 л та збірників сумарний об'єм яких складає 7050 л. Відміряємо 21,15 л концентрату та переливаємо його у ємність об'ємом 8000 л (РЗ-1). Додаємо 7028,85 л питної води. Приготований 0,3 % робочий розчин Біомою дозволяється зберігати

протягом 14 днів у щільно закритій тарі. Приготований робочий розчин Біомою подають на стадію ДР 1.4.1.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

Підготовка виробничих приміщень — одне з найважливіших заходів щодо забезпечення чистоти і зведення до мінімуму механічних і мікробних забруднень під час виробничого процесу.

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання

Щоденне прибирання виробничих приміщень здійснюється персоналом 1 раз на зміну. Робочий персонал повинен бути вдягнутий у гумові рукавиці, взуття та фартух, з метою уникнення пошкоджень шкіри та одягу дезінфікуючими розчинами.

Стіни, двері і інші поверхні протирають поролоновою губкою, яка змочена дезінфікуючими робочими розчинами Дезактину (від ДР 1.2.1.1.) та Хлорантоїну (від ДР 1.2.1.2.), потім цими ж розчинами миють підлогу.

При проведенні прибирання приміщень користуються 0,2% робочими розчинами Дезактину та Хлорантоїну. Відпрацьований розчин направляється на стадію знешкодження рідких відходів.

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

При генеральному прибиранні виробничого приміщення застосовується 0,2 % розчин Хлорантоїну та Дезактину. Прибирання здійснюється один раз на місяць. Розчином обробляють поверхні приміщень: стіни, підлогу, стіни, вікна та двері. Стіни, двері і інші поверхні протирають паролоновою губкою, яка змочена дезінфікуючим розчином, потім цим же розчином миють підлогу. Відпрацьований розчин направляється на стадію знешкодження рідких відходів.

ДР 1.4. Підготовка технологічного обладнання

Підготовка технологічного обладнання включає в себе миття, ополіскування обладнання та перевірку його на герметичність. Метою проведення робіть, щодо підготовки технологічного обладнання є запобігання контамінації середовища сторонніми мікроорганізмами.

ДР 1.4.1. Миття обладнання

Миття обладнання здійснюється водопровідною водою із застосуванням 0,3 % розчину Біомою (від ДР 1.2.2.1.). Для миття обладнання використовується безрозбірна CIP мийка. В станцію CIP мийки завантажується робочий розчин дезінфікуючого засобу Біомой та дистильована вода. Вводяться параметри обраних миючих розчинів температура. Відпрацьований миючий розчин направляється на знешкодження.

ДР 1.4.2. Ополіскування обладнання

Після миття ферментер ополіскують холодною водою упродовж 10 хв. Стічні води зливаються і направляються на стадію знешкодження відходів.

ДР 1.4.3. Перевірка обладнання на герметичність

Перевірка обладнання на герметичність здійснюється за допомогою течієшукача. Перед набором тиску в апарат вносять невелику кількість леткої галогеновмісної речовини, зазвичай це чотирихлористий карбон або шестифтористий сульфат, закривають усю запірну арматуру та нагрівають апарат до 30 ^{o}C і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа. Якщо в апараті наявні нещільності, то при наближення щупа течіє шукача до них, пристрій буде подавати сигнал. Тривалість перевірки одного апарату цим методом становить 1,5-2 години.

ДР 1.4.4. Стерилізація обладнання

Після дезінфекції, ополіскування та перевірки обладнання та комунікацій на герметичність у ферментер подають насичену водяну пару, яку подають під тиском 0,28 – 0,3 МПа. Процес поділяють на три стадії. Попередньо в сорочку апарата подають глуху пару і прогрівають апарат до температури 80-90 ^{o}C. Далі подають гостру пару безпосередньо в апарат через нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення пари з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації 130 – 135 ^{o}C закривають всю запірну арматуру, крім парової, і витримують заданий час стерилізації (60 хвилин). При охолодженні закривається вся запірна арматура подачі пари в апарат. У сорочку подається холодна вода. Процес охолодження

здійснюється до досягнення температури до 30-40 ^{o}C і надлишковому тиску Р=0,003 – 0,005 МПа. Разом весь процес стерилізації одного ферментера становить 2,5 години. На стадії стерилізації обладнання контролюється температура, тиск водяної пари (0,28 – 0,3 МПа), час стерилізації (1 година) та відсутність сторонньої мікрофлори.

ДР 2. Приготування та стерилізація підлужнюючого розчину NaOH

При культивуванні біфідобактерій є необхідність підлужнювати pH середовища за допомогою лугу, оскільки про культивуванні біфідобактерії продукують молочну та оцтову кислоти.

ДР 2.1. Приготування 6% розчину NaOH

Для одного виробничого циклу необхідно приготувати 11,36 л 6% розчину NaOH. Зі складу беруть сухий NaOH, який являє собою білі, непрозорі кристали. Для розчинення використовують питну воду. Для приготування 1 л 6% розчину NaOH необхідно 0,06 кг сухого натрій гідроксиду, тоді для приготування 11,36 л необхідно 0,68 кг сухого натрій гідроксиду. Оскільки при стерилізації утвориться конденсат (1,1 л), необхідно розрахувати кількість води, яку необхідно додати: $V_{води}$= 11,36 – 0,68 – 1,1 = 9,58 л. Отже, для приготування 11,36 л 6 % розчину необхідно 680 г сухого NaOH та 9,58 л питної води. На технічних вагах зважують 680 г сухого натрій гідроксиду, поміщають у збірник об’ємом 15 л та додають 9,58 л питної води. Для приготування розчину використовую збірник з сорочкою та мішалкою об’ємом на 15 л.

ДР 2.2. Стерилізація 6% розчину NaOH

Приготований 6% розчин NaOH стерилізують в збірнику об’ємом 15 л гострою парою при температурі 131°С і тиску 0,15 протягом 45 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживних середовищ для отримання посівного матеріалу в колбах

Для вирощування інокуляту в колбах необхідно приготувати 2,48 л поживного середовища. Для вирощування *B. bifidum* в колбах використовують гідролізатно – молочне середовище, яке містить, як джерело вуглецю та енергії, лактозу, а джерелом азоту в середовищі є пептон. Оскільки поживне середовище для культивування *B. bifidum* (гідролізатно – молочне середовище) є багатокомпонентним та містить термолабільні (лактоза, пептон) та термостабільні компоненти (натрій хлористий), які не можна стерилізувати при однаковій температурі, середовище було поділене на композиції для стерилізації в автоклаві. Вміст компонентів для приготування 2,48 л середовища наведено в табл.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2,48 л гідролізатно-молочного середовища для *B. bifidum*

Компонент поживного середовища середовища, кг (л)	Вміст, г/л	Кількість для приготування 2,48 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Пептон	2,0	0,005	А	2,46
Гідролізат молока	50	1,25		
Цистин солянокислий,	0,1-0,15	0,00037		
Лактоза	10,0	0,025		
Вода		1,178		
Натрій хлористий	2,0-3,0	0,0075	Б	0,0144
Вода		0,0069		
Всього		2,48		2,48

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 0,005 кг пептону, 0,025 кг лактози, 1,25 кг гідролізату молока та 0,00037 кг цистину солянокислого в мірних стаканах. На аналітичних вагах зважують. Наважки поміщають в колбу об'ємом 5 л. Додаємо 1,178 л питної води, перемішуємо. Колбу закривають ватно – марлевою пробкою. Стерилізацію термолабільних компонентів середовища проводять в автоклаві при температурі 112℃ упродовж 40 хвилин. Проводять мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікрофлори.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізації композиції Б

Зважують на технічних вагах 0,0075 кг хлористого натрію в мірному стакані. Наважку поміщають в колбу об'ємом 1 л. Додають 0,0069 л питної води та перемішують її з сіллю. Колбу закривають ватно – марлевою пробкою та стерилізують сіль в автоклаві при температурі 131 ℃ упродовж 40 хвилин. Проводять мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для отримання посівного матеріалу в інокуляторі

Для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 40 л необхідно приготувати 26 л поживного середовища. Для вирощування *B. bifidum* в інокуляторі використовують гідролізатно – молочне середовище, яке містить, як джерело вуглецю та енергії, лактозу, а джерелом азоту в середовищі є пептон. Оскільки поживне середовище для культивування *B. bifidum* (гідролізатно – молочне середовище) є багатокомпонентним та містить термолабільні (лактоза, пептон) та термостабільні компоненти (натрій хлористий), які не можна стерилізувати при однаковій температурі, середовище було поділене на композиції для стерилізації в автоклаві. Вміст компонентів для приготування 26 л середовища наведено в табл.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 26 л гідролізатно-молочного середовища для *B. bifidum*

Компонент поживного середовища середовища, кг (л)	Вміст, г/л	Кількість для приготування 26 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Пептон	2,0	0,054	А	23,27
Гідролізат молока	50	13		
Цистин солянокислий,	0,1-0,15	0,0039		
Лактоза	10,0	0,26		
Конденсат		2,585		
Вода		9,95		
Натрій хлористий	2,0-3,0	0,078	Б	0,135
Конденсат		0,015		
Вода		0,057		
Конденсат		2,6		2,6
Всього		26		26

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах в мірному стакані зважують 0,054 кг пептону, 0,26 кг лактози та 0,0039 кг цистину солянокислого. 13кг гідролізату молока зважуємо в ємностях для зважування на електронних вагах. Наважки поміщають в збірник об’ємом 30 л (РЗ-5). Додаємо 9,95 л питної води, перемішуємо. Стерилізацію термолабільних компонентів середовища проводять безпосередньо в інокуляторі при температурі 112℃ упродовж 40 хвилин. Проводять мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікрофлори.

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізації композиції Б

Зважують на технічних вагах 0,078 кг хлористого натрію. Наважку поміщають в колбу об'ємом 1 л. Додають 0,057 л питної води та перемішують її з сіллю. Колбу закривають ватно – марлевою пробкою та стерилізують сіль в автоклаві при температурі 131 ℃ упродовж 40 хвилин. Проводять мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживних середовищ для отримання посівного матеріалу в ферментері.

Для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 400 л необхідно приготувати 258,2 л поживного середовища (без урахуванням конденсату). Для вирощування *B. bifidum* в інокуляторі використовують гідролізатно – молочне середовище, яке містить, як джерело вуглецю та енергії, лактозу, а джерелом азоту в середовищі є пептон. Оскільки поживне середовище для культивування *B. bifidum* (гідролізатно – молочне середовище) є багатокомпонентним та містить термолабільні (лактоза, пептон) та термостабільні компоненти (натрій хлористий), які не можна стерилізувати при однаковій температурі, середовище було поділене на композиції для стерилізації в збірнику та посівному апараті. Вміст компонентів для приготування 258,2 л середовища наведено в табл.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 258,2 л гідролізатно-молочного середовища для *B. bifidum*

Компонент поживного середовища середовища, кг (л)	Вміст, г/л	Кількість для приготування 258,2 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Пептон	2,0	0,52	А	231,03
Гідролізат молока	50	129		
Цистин солянокислий,	0,1-0,15	0,039		
Лактоза	10,0	2,58		
Конденсат		26,67		
Вода		98,889		
Натрій хлористий	2,0-3,0	0,77	Б	1,35
Конденсат		0,15		
Вода		0,58		
Конденсат		25,8		25,8
Всього		258,2		258,2

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах в мірному стакані зважують 0,52 кг пептону та 0,039 кг цистину солянокислого. На електронних вагах зважують 2,58 кг лактози та 129 кг гідролізату молока у ємностях для зважування. Наважки поміщають в збірник об’ємом 300 л. Додаємо 98,889 л питної води, перемішуємо. Стерилізацію термолабільних компонентів середовища проводять безпосередньо в посівному апараті при температурі 112℃ упродовж 40 хвилин. Проводять мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікрофлори.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізації композиції Б

Зважують на технічних вагах в стакані 0,77 кг хлористого натрію. Наважку поміщають в колбу об’ємом 2 л з сорочкою та мішалкою. Додають 0,58 л питної води та перемішують її з сіллю. Стерилізують сіль в автоклаві при температурі

131 ℃ упродовж 40 хвилин. Проводять мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

Посівний матеріал штаму *B. bifidum*, для виробничого культивування, отримують в 5 колбах об'ємом 750 мл, в інокуляторі об'ємом 40 л та у посівному апараті об'ємом 400 л. Посівний матеріал для виробничого культивування отримують на гідролізатно – молочному середовищі.

ТП 4.1. Ведення музейної культури

До флаконів з ліофільно висушеним штамом колекційної культури *B. bifidum*, з концентрацією клітин 10^8 – 10^9 КУО/мл, додають фізіологічний розчин хлориду натрію (1 $см^3$ на дозу). Вміст флакону ретельно перемішують та використовують для вирощування культури І генерації [54].

ТП 4.2. Вирощування культури І генерації на агаризованому середовищі

Розведену у фізіологічному розчині культуру штаму *B. bifidum* (переносять у пробірки, які містять гідролізатно – молочне середовище. Пробірки закривають резиновою пробкою, оскільки даний штам є облігатним анаеробом, та вирощують в лабораторії в термостаті при температурі 38 ± 1℃. Мікробіологічний контроль культури І генерації здійснюється кожні 2 години шляхом мікроскопіювання за методом «роздавлена крапля» та висіву культури на МПА для виявлення сторонніх бактерій та на середовище Сабуро – для грибів та дріжджів. Якщо сторонньої мікрофлори немає, то культуру І генерації використовують як посівний матеріал для одержання культури ІІ генерації. Концентрацію живих клітин на кінець культивування повинна бути не менше ніж 10^8 КУО/мл. Тривалість культивування культури І генерації 48 години .

ТП 4.3. Вирощування культури ІІ генерації в колбах

Для вирощування посівного матеріалу штаму *B. bifidum* 791 – ИН ІІ генерації (2,7 л) використовують 5 колб об'ємом 750 мл. Вносять в асептичних умовах 2,46 л розчину композиції А та 0,0144 л композиції Б. Перемішують

вміст колб. В асептичних умовах відбирають посівний матеріал культури І генерації, який накопичився у пробірках, та переносять в колби з приготовленим та простерилізованим гідролізатно – молочним поживним середовищем. Колби закривають резиновими пробками. Вирощування культури в лабораторії в колбах відбувається до накопичення біомаси 10^8 КУО/мл без перемішування, оскільки даний штам є облігатним анаеробом. Тривалість культивування становить 48 годин. При вирощуванні культури ІІ генерації контролюють температуру (38 ± 1 ℃). Мікробіологічний контроль культури ІІ генерації здійснюється кожні 2 години шляхом мікроскопіювання та висіву культури на МПА (для виявлення бактерій) та середовище Сабуро (для грибів та дріжджів). Якщо контамінація сторонніми мікроорганізмами відсутня, то культуру ІІ генерації використовують для виробничого культивування у ферментері.

ТП 4.4. Вирощування культури ІІІ генерації в інокуляторі

Для вирощування культури ІІІ генерації штаму *B. bifidum* (25,8 л) використовується інокулятор об'ємом 40 л (ФР-20). У попередньо простерилізований інокулятор вносять 23,27 л композиції А та 0,135 л композиції Б . Підготовлений посівний матеріал, в асептичних умовах, вносять в обсязі не більше 10%. Процес культивування відбувається при температурі 38±1 ℃. При вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі контролюють температуру культивування (38±1℃), концентрацію живих клітин (10^9 КУО/мл), відсутність сторонньої мікрофлори та pH середовища культивування (pH = 7-7,2,). Мікробіологічний контроль культури ІІІ генерації здійснюється кожні 2 години шляхом мікроскопіювання за методом «роздавлена крапля» та висіву культури на МПА для виявлення сторонніх бактерій та на середовище Сабуро – для грибів та дріжджів. Якщо сторонньої мікрофлори немає, то культуру ІІІ генерації використовують як посівний матеріал для одержання культури IV генерації. Коригування pH середовища здійснюють за допомого 6% розчину NaOH.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування штаму B.bifidum

Виробниче культивування штаму *B.bifidum* здійснюється у ферментері об'ємом 500 л на гідролізатно – молочному середовищі. У попередньо простерилізований в ферментер вносять 228,6 л композиції А та 1,37 л композиції Б . Підготовлений посівний матеріал, в асептичних умовах, вносять в обсязі не більше 10% у ферментер. Процес культивування відбувається при температурі 38±1℃ . Тривалість культивування штаму *B. bifidum* становить 16 – 18 годин.

Щоб забезпечити анаеробні умові культивування, у ферментер подають суміш азоту та вуглекислого газу, яка витискає повітря. В якості інертного газу також використовують аргон, діоксид вуглецю, водень або гелій. Доцільність використання сушімі азоту та вуглекислого газу полягає в тому, що азот повність витискає із ферментера кисень, а вуглекислий газ запобігає контамінації середовища сторонніми мікроорганізмами. Перемішування здійснюється лише під час відбору проб та коригування pH 6% - м розчином NaOH протягом 3-7 хв. при 70 – 100 об./хв. Весь інший процес вирощування біомаси проходить без перемішування. При виробничому культивуванні обов'язково контролюють концентрацію клітин біфідобактерій, яка на кінець культивування повинна бути не менше 10^9 КУО/мл. На стадії виробничого культивування проводиться контроль температури, яка має становити 38±1℃ , pH середовища, що повинен бути в межах від 7 до 7,2, та тривалість культивування (16 – 18 годин). Також контролюють відсутність контамінації в середовищі мікроскопіюванням за методом «роздавлена крапля» та висівом культури на МПА, для виявлення сторонніх бактерій, та на середовище Сабуро, для виявлення грибів та дріжджів. Відбір проб проводять кожні 2 години. Тривалість культивування становить 16 – 18 годин. Коригування pH середовища здійснюється 6% розчином NaOH. Після культивування культуральна рідина подається за допомогою труби перетискування до збірника культуральної рідини.

. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

. Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Метод контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Км 1.1.2. Підготовка виробничого персоналу	Руки виробничого персоналу	Мікробіологічна чистота	1раз/ 2тижні	C≤25 КУО D≤50 КУО
Кх 1.3.1.2 Приготування розчину перекису водню	Розчин перекису водню	Перевірка концентрації	Під час приготування розчину Час зберігання	C = 3 % T = 5 діб
Кх 1.21.1 Приготування розчину Дезактіну	Розчин Дезактін	Перевірка концентрації	Під час приготування розчину Час зберігання	C = 0,3 % T = 5 діб
Кх 1.2.1.2 Приготування розчину Хлорантоїну	Розчин Хлорантоїну	Перевірка концентрації	Під час приготування розчину Час зберігання	C = 0,6% T = 3 доби
Кх 1.2.2.1 Приготування розчину Біомою	Розчин Біомою	Перевірка концентрації	Під час приготування розчину Час зберігання	C = 0,5% T = 3 доби
Км 1.3 Підготовка виробничих приміщень	Поверхні приміщення	Чистота приміщення	Після прибирання	C ≤ 25 КУО D ≤ 50 КУО
Кт. Кх 1.4.1 Миття ферментеру	Внутрішня поверхня ферментера	Манометр технічний Термометр Годинник	Під час миття	t = 100ºC T = 45-60хв. P = 0,5 МПа
Кт 1.4.2 Перевірка на герметикність ферментеру	ферментер	Манометр технічний	Тиск визначаються безперервно під час перевірки на герметичність	P = 0,15-0,2 МПа

Кт, Км 1.4.4 Стерилізація ферментера	Ферментер	Манометр технічний Термометр Мікробна контамінація	Температура та тиск визначаються безперервно під час стерилізації. Стерилізацію проводять вибірково не менше 1 разу на тиждень та за 1,5 години до початку роботи (висівом на чашки Петрі)	P = 0,2 МПа T = 125-130 ^{o}C У змивах з площі 10х10 см ріст мікроорганізмів не допустимий
Кх 2. Приготування та стерилізація підлужного розчину NaOH	Фільтр грубої очистки		Ступінь очищення	E=80%
Кх 2.1 Приготування 6% розчину NaOH	Конденсор		Температура	t_1=25-40˚C; t_2=70-90˚C
Кт, Км, 2.2 Стерелізація 6% розчину NaOH	Фільтри тонкого очищення		Ступінь очищення повіторя	E(клас D)=95% E(клас C)= 99,95%
Кт,Кх 3 Приготування та стерелізація поживних середовищ			Контролюється постійно	
Кт,Км 3.1.1 Приготування та стерилізація композиції А	Фільтри тонкого очищення	Годинник Термометр	Контролюється постійно	t = 20 ^{o}C T = 30 хв
Кт 3.1.2 Приготування композиції Б	Фільтри тонкого очищення	Швидкість току	Контролюється постійно	d = 0,0005-0,001 мкм
Кт, Кх 3.2 Приготування та стерилізація поживних середовищ для отримання посівного матеріалу в інокуляторі	Вода очищена	Термометр Годинник Мікробна контамінація	Контролюється постійно	t = 25 □C КУО=0
Кт,Км 3.2.1	Розчин	Манометр технічний	Перевіряється	t = 112 °C,

Приготування та стерилізація композиції А	гідроксиду натрію	Термометр Годинник	безпосередньо під час процесу	Р = 0,25 МПа Т = 15хв. С=10%
Кт, Кх 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Вода питна, натрій хлористий	Манометр технічний Термометр Годинник	Перевіряється безпосередньо під час процесу	t = 120 °С, Р = 0,11 МПа Т = 20хв. С=20%
Кт, Кх 3.3. Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробного біоситезу		Ферментер	Перевіряється безпосередньо під час процесу.	t= 112-125°С Т = 30хв.
Кт, Кх 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Пептон, гідролізат молока, цистин солянокислий, вода питна	Манометр технічний Термометр Годинник	Перевіряється безпосередньо під час процесу	t = 120 °С, Р = 0,1 МПа Т = 20хв.
Кт,Км 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Вода питна, натрій хлористий	Манометр технічний Термометр Годинник	Перевіряється безпосередньо під час процесу	t = 130 °С, Р = 0,15 МПа Т = 1 год.
Кт, Км 4.2 Отримання культури І генерації на агаризованому середовщі	Флакони з культурою	Термометр,	Перевіряється безпосередньо під час процесу	t = 100 °С Р = 0,15МПа Т = 15хв.
Кт, Км 4.3 Отримання культури ІІ генерації в колбах	Колби з культурою	Манометр технічний Термометр Годинник	Перевіряється безпосередньо під час процесу	t = 115 °С Р = 0,07МПа Т = 45хв. рН=7,4-7,6
Кт, Кх, Км 5.1 Виробничий синтез	Ферментер	Термометр	Під час приготування	t = 50-60 ˚С

Мікробіологічний контроль

Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси визначають за допомогою датчику визначення оптичної густини BE-2700. Безконтакний онлайн датчик, що кріпиться до зовнішньої стінки ферментеру (смотрового люку). У датчику BE2100 використовуються інфрачервоні лазери і детектори. Кожна пара лазер-детектор в матриці чутлива до різних діапазонах зміни концентрації біомаси.

Має графічний і цифровий дисплей даних з отображенієм в режимі реального часу. За допомогою програмного забезпечення можна калібрувати датчик в будь-яких можливих одиницях (г/л, од./мл).

Визначення кількості життєздатних біфідобактерій

Кількість живих біфідобактерій перевіряють паралельно з робочим стандартним зразком (РСЗ) біфідумбактерину.

1 мл культури переносять у пробірки, що містять по 9 мл Біфідум-середовища та перемішують шляхом 12-15 кратного прокачування, отримуючи при цьому 1 дозу біфідобактерій в об'ємі 10 мл середовища. З цих пробірок роблять послідовні десятикратні розведення від 10^{-1} до 10^{-9}. Пробірки з розведеннями досліджуваних зразків препарату і РСЗ у поживних середовищах (починаючи з 10^{-1}) поміщають в анаеростат при температурі (37±1) °С і інкубують протягом 4-х діб.

Після закінчення інкубації відмічають розведення, в яких є ріст колоній біфідобактерій.

Якщо вміст живих мікробних клітин в культуральній рідині менше ніж 10^7, а в 1 мл РСЗ-10^7, тоді контроль необхідно повторити на подвоєній кількості зразків.

Визначення активності кислотоутворення клітин.

Активність кислоутворення клітин визначають титрометричним методом. По 10мл культури вносять у дві хімічні склянки місткістю 50мл і титрують 0,1М розчином натрію до pH (8,5±0,5). Показник pH контролюють потенціометрично. Кислотність у градусах Тернера визначають за формулою: ºT=VK×10,

Де V - об´єм 0,1 М гідроксиду натрію, використаний на титрування, мм;

К – коефіцієнт поправки до титру 0,1 М розчину гідроксиду натрію.

Середнє значення активності кисло утворення, отримане для двох зразків, має бути не нижче ніж 90ºТ.

У разі отримання в одному із зразків показників кислотності нижче ніж 90ºТ дослід повторюють.

Дослідження на сторонню мікрофлору

Контроль на відсутність сторонніх мікроорганізмів проводять:

1. Методом мікроскопії - шляхом перегляду мазків, приготованих із зависі розчиненого препарату та пофарбованих по Граму. В мазках повинні бути позитивні поліморфні палички з можливою біфуркацією на одному або двох кінцях, щорозміняться у вигляді скупчень або окремих клітин.

2. Мікробіологічним методом – шляхом посіву на м’ясопептонний агар, м’ясопептонний агар з 5% глюкозою та агаризоване середовище Сабуро. Висівають по 0,5 культуральної рідини мл у пробірки (по 2 пробірки з поживним середовищем).

Посівний матеріал розподіляють по всій поверхні поживного середовища погойдуючи пробірку. Посіви на МПА, агаризованому середовищі Сабуро інкубують при температурі 37ºС (спочатку в горизонтальному положенні (протягом 2 діб), а потім - у вертикальному положенні. Результати посівів враховують через 48 годин , 72 години і через 8 діб. Посіви на агаризованому середовищі Сабуро інкубують при температурі (22 ±1)°С протягом 8 діб.

Після інкубації посівів протягом вказаних термінів на поживних середовищах МПА не повинно виявлятися росту сторонніх мікроорганізмів, на твердому агаризованому середовищі Сабуро - росту грибів. У випадку виявлення у посівах сторонніх мікрорганізмів контроль повторюють на подвоєній кількості зразків препарату. При відсутності росту мікроорганізмів при повторному висіві досліджувану культуральну рідину вважають відповідає вимогам. У випадку росту сторонніх мікроорганізмів при повторному висіві зразків, хоча б в одній пробірці, серію бракують.

Визначення антагостичної активності методом агарових блоків

1 $см^3$ культуральної рідини переносять у стерильну чашку Петрі, вносять 15-20 $см^3$ розплавленого агаризованого середовища, охолодженого до температури (45±1) ºС, ретельно перемішують і залишають чашки на холодній горизонтальній поверхні до затвердіння середовища.

Вирощування здійснюють в анаеробних умовах за температури 37ºС упродовж 72 год, після чого агаризований блок вирізають пробійником та розміщують у центрі чашки Петрі з середовищем Гаузе-2 (або будь-яким іншим, придатним для вирощування досліджуваних патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів) і радіально підсівають тест-культури. Засіянні чашки інкубують за температури 37ºС увпродовж 72 год. Ступінь чутливості оцінюють за розміром зон затимки росту, мм: 5-15 – малочутливі, 15-20 – помірно чутливі; 30-40 – високочутливі.

Визначення адгезивної активності експрес-методом

Для цього методу використовують 0.1 М фосфатний буфер в ізотонічному розчині хлориду натрію (рН 7,2-7,3) мікроорганізми вирощують у рідкому середовищі МРС увпродовж 2 діб за температурою 37ºС. Субстратом є формалізовані еритроцити людини, попередньо двічі відмиті буферним розчином з центрифугуванням (300-1000 об/хв.) Використовують суспензію еритроцитів концентрацією 108 кл/$см^3$ буфера.

Для проведення досліду на предметне скло наносять одну краплину буферного розчину, в якому суспендують по одній краплині (посівною петлею) суспензії еритроцитів та мікроорганізмів безпосередньо з поживного середовища. На одному скельці можна одночасно помістити до п´яти зразків. Предметне скельце з еритроцитами та мікроорганізмами поміщають у вологу камеру (чашку Петрі) на 30 хв. За температури 37ºС. Потім препарат сушать за тієї самої температури, фіксують жаром та фарбують метиленовим синім або фуксином.

Ступінь адгезії аналізують у світловому мікроскопі. Адгезивні властивості оцінюють за допомогою середнього показника адгезії (СПА) – середньої кількості мікроорганізмів, що прикріплено до одного еритроциту при підрахунку не менш як 25 еритроцитів в одному полі зору. Залежно від значення показника СПА адгезивність вважають нульвою(0-1,0), низькою (1,01-2,0), середньою (2,01-4,0) або високою (понад 4,0).

ЛІТЕРАТУРА

1. *Артюхова С.И.* Влияние пробиотических продуктов на здоровье человека / С.И. Артюхова, О.Н. Жидкова // Юбилейный сборник науч. работ. – Омск, 2002. – С. 18–21.

2. *Балаклієц Н.І.* Загальна мікробіологія.: Навч. посібник., Харківський мед. ун-т. У. Основа, 2001 – 258с.

3. *Белоусов Ю.В.* Пробіотики та пребіотики в корекції кишкового дисбіозу у дітей // Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2005. М – № 5. – С. 57– 60.

4. *Береговая Т.В.* Применение пробиотиков в клинической практике: горизонты расширяются // Здоровье Украины. – 2008. – № 4. С. 18–25.

5. *Бондаренко В.М., Рыбальченко О.В., Болдырев А.Г.* Использование сорбентов сфероцедд для конструирования иммобилизованных пробиотиков // Журнал микробиологии – 2009. – № 5. – С. 66–70.

6. *Векірчик К. М.* Мікробіологія з основами вірусології: Підручник. – К.: Либідь, 2001р. – 312 с.

7. *Воробьев А.А., Лыкова. Е.А., Л.Ф. Феклисова*. Использование больших доз пробиотика Бифидумбактерина форте в лечении ОРВИ у детей: Клинические и иммунобиологические результаты // Микроэкология и терапия – 2004. - № 1. – С.23–45.

8. *Григор`єва С.М.* Біологічні властивості біфідобактерій, як критерії оцінки якості пробіотиків: Автореф. дис. … канд. біол. наук. – Київ, 2011. –12 с.

9. *Демешева М.И., Мезенцева Л.Н., Лимарева Т.Д.* Технологические аспекты производства Бифидумбактерина // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – Т.24. №2. – С. 71–76.

10. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-ше видан. – Х.: РІРЕГ, 2001. – Допов. 1. – 2004. – 520 с.

11. *Зеленая Л.Б., Коваленко Н.К., Полтавская О.А.* Внутривидовое разнообразие бифидобактерий, колонизирующих желудочно-кишечный тракт человека // Мікробіологічний журнал – 2011. – № 3. – С. 9-13.

12. *Квасников Е.И.* Молочнокислые бактерии и пути их использования, 1985. – 82с.

13. Коваленко Н.К., Полтавська О.А. Культивування біфідобактерій і стимуляція їх росту // X з`їзд ТМУ (Одеса, 21-22 серпня 2009 р.). – С. 70-75.

14. *Кривопустов С.П.* Современные аспекты дисбиоза кишечника у детей и подходы к его коррекции (лекция для врачей). – К., 2001. – 24 с.

15. *Кременчуцький Г.М., Радченко А.Г., Прокоп`єва І.Ю.* Порівняльний аналіз чутливості патогенних мікроорганізмів до пробіотиків // Друга міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів « Молодь і поступ біології»(Львів, 10 – 13 листопада 2006р.).- С 90–90.

16. *Ленгелера Й.; Древса Г.; Шлегеля Г.* Современня микробиология. Прокариоты,– Т.1, 2005. – 654с.

17. *Лизько Н.Н., Шилов В.И.* Современные представления о состоянии кишечной микрофлоры у здоровых взрослых людей // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.- 2000. – №4. – С. 36-41.

18. *Литвин Г.О.* Нові пробіотики в лікуванні гострих кишкових інфекцій., спричинених умовно-патогенною флорою, у дітей раннього віку // Педіатрія – 2010. - № 2. – С.11–13.

19. *Пат. № 2076722 RU, , A61K35/74*. Способ получения сухой биомассы лакто-, коли- или бифидобактерий / Пучнин В.С.,Чугунова Н.Н., Несчисляев В.А. – Опубл. 10.04.1997, Бюл. № 5.

20. *Пат. № 75475 Ua, МПК С 2, A61K35/74, C12N1/20*. Спосіб одержання біомаси біфідобактерій / Курищук К.В., Діденко Н.Ю., Ахмедова Т.М. – Опубл. 17.04.2006, Бюл. № 4.

21. *Пат. № 2451723 RU, МПК С 12, A61K8/99, C12N1/00*. Штамм *Bifidobacterium bifidum*, используемый для получения бифидосодержащей продукции / Левченко Т.А., Лянная А. М. – Опубл. 27.05.2012, Бюл. № 9.

22. *Пат. № 56674 UA, МПК C12N1/04*. Спосіб консервування культури *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 / - Опубл. 25.01.2011, Бюл. № 2.

23. *Пат. № 75475 Ua, МПК С 2, А61К35/74, С12N1/20*. Спосіб одержання біомаси біфідобактерій / Курищук К.В., Діденко Н.Ю., Ахмедова Т.М. – Опубл. 17.04.2006, Бюл. № 4.

24. *Пєшкова В.М., Саяпіна О.Я., Солдаткін О.О.* Ферментний кондуктометричний біосенсор для визначення лактози // Біотехнологія. – 2008. - № 4. – С. 76-84.

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

26. *Пирог Т.П., Ігнатова О.А.* Загальна біотехнологія: Підручник –К.: НУХТ, 2009. – 336с.

27. Определитель Бактерий Берги – 9-е изд./Пер. Под. ред. *Г.А. Заварзина-М.*: Мир, 1997 – Т.1,2. – 800с.

28. *Рябцева С.А.* О классификации бифидогенных факторов // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы: Сб. матер, междунар. конф. 2-4 июня 2004 г. М., 2004. – 96с.

29. *Сидоров Ю.І.* Пілотні ферментери ємнісного типу // Біотехнологія. – 2012. - № 2. – С. 68–75.

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

31. *Старовойтова С.0.* Сучасні аспекти технології іммобілізованих пробіотиків // Біотехнологія – 2012. – № 4. – С.9–19.

32. *Agostoni C., Axelson I., Braegger C.* et al. Probiotic bacteria in dietetic products for infants: a commentary by ESPGHAN Committee on nutrition // J. of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. - 2006.-Vol. 38.- P. 365–374.

33. *Babenko L.P., Lazarenko L.M., Shynkarenko L.M.* The effect of Lacto- and Bifidobacteria monoculture in the vaginal microflora in norm and cases of intrevaginal staphylococcosis // Мікробіологічний журнал – 2013. – № 3. – С46–53.

34. *Chou K.M.* Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods // J. Onio, – 1995. – №7. – С. 25–34.

35. *Clark P.A., Martin J.H.* Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods // III- Tolerance to simulated bile concentralions of human small intestines Cult. – 1994. –№ 5. – P. 4852.

36. *O'Mahony L.J., McCarthy J., Kelly P.* et al. Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles // Gastroenterology. – 2005. – Vol. 8. P. 39–51..

37. *Perez P., Dore J., Leclers O.* et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from Maternal cells // Pediatrics. – 2007. – N 6. – P. 724–732.

Runlin H., C.Edward Ebert, Zhihozng Zhao. Novel characteristics of *Bifidobacterium bifidum* in solid state fermentation system // World Journal of Microbiologi and Biotechnology – 2005. – V. 2. – C. 1245–1248.