

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА БІОХІМІЇ, МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ФІЗІОЛОГІЇ
ХАРЧУВАННЯ



ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА

до кваліфікаційної роботи бакалавра

на тему: «**ТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА СТАНДАРТИЗОВАНИХ**
МІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ»

Здобувач
студент 5-го курсу,
групи БіО₃-51

І.А. Михайлова

Керівник
проф. кафедри БМтаФХ

Л.М Пилипенко

Кваліфікаційна робота бакалавра допускається до захисту

Рішення кафедри від 31.05. 2023 р., протокол № 9

Зав. кафедри БМтаФХ

Л.В. Капрельянц

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет
Кафедра

Технології вина та туристичного бізнесу
Біохімії, мікробіології та фізіології
харчування

Ступінь вищої освіти
Спеціальність
Освітньо-професійна
програма

Бакалавр
162 «Біотехнології та біоінженерія»
«Біотехнології і біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри БМтаФХ
_____ Л.В. Капрельянц

«___» _____ 2023 р.

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Михайлової Ірини Анатоліївни

1. Тема кваліфікаційної роботи бакалавра «Технологія виробництва стандартизованих мікробних препаратів», затверджена наказом вищого навчального закладу від «13» вересня 2022 року №565-03

2. Термін здачі здобувачем закінченої роботи 5 червня 2023 року

3. Вихідні дані до роботи «Технологія виробництва стандартизованих мікробних препаратів»:

<i>Потужність підприємства у флаконах на рік (G, тис.)</i>	933,2
<i>Кількість робочих днів у рік (T_{рл})</i>	308

4. Перелік питань, які потрібно розробити: Зробити аналіз літератури щодо виробництва стандартизованих мікробних препаратів, обґрунтувати необхідність у пробіотичних препаратах, охарактеризувати форми та технології їх отримання, склад та якість поживних середовищ; провести технологічні розрахунки; описати особливості технології отримання; провести аналіз інвестиційної привабливості проекту; надати висновки та рекомендації; навести список літератури.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень): Лист 1 – Постадійна схема технології отримання мікробних

препаратів. Лист 2 – Апаратурна схема технології. Лист 3- ферментер у розрізі.

Лист 4- результати економічних розрахунків та НДРС.

6. Консультанти розділів кваліфікаційної роботи бакалавра

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Технологічна частина	Пилипенко Л.М., проф.	02.02.2023	25.05.2023
Охорона праці та навколишнього середовища	Килименчук О.О., доц.	28.04.2023	19.05.2023
Економічні розрахунки	Крупіна С.В., доц.	28.04.2023	19.05.2023

7. Дата видачі завдання « 02 » 02 2023 р.

Керівник _____ Пилипенко Л. М.

Завдання прийняв
до виконання _____ Михайлова І.А.

Несу відповідальність за ідентичність електронного та друкованого варіанту кваліфікаційної роботи. Даю згоду на обробку персональних даних та не заперечую проти розміщення кваліфікаційної роботи на офіційних web-ресурсах ОНТУ. Підтверджую, що в кваліфікаційній роботі відсутні порушення доброчесності.

Здобувач _____ Михайлова І.А.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1.	Узгодження дипломного проекту з керівником	01.09.22-10.09.22	Виконав
2.	Огляд літератури за темою дипломного проекту	02.02.23-27.02.23	Виконав
3.	Анотація. Розділ 1 «Огляд літератури»	28.02.23-20.03.23	Виконав
4.	Розділ 2 «Техніко-економічне обґрунтування технології»	28.02.23-31.03.23	Виконав
5.	Розділ 3 «Опис технології отримання стандартизованих мікробних препаратів»	03.04.23-28.04.23	Виконав
6.	Розділ 4 – «Продуктовий розрахунок і матеріальний баланс мікробних препаратів». Підбір обладнання, опис технології отримання мікробних препаратів. Виконання графічної частини.	03.04.23-28.04.23	Виконав
7.	Розділ 5 «Охорона праці та навколишнього середовища»	28.04.23-19.05.23	Виконав
8.	Розділ 6 « Економічні розрахунки» Висновки.	28.04.23-19.05.23	Виконав
9.	Оформлення дипломного проекту та його презентації. Перевірка роботи керівником.	22.05.23-26.05.23	Виконав
10.	Попередній захист дипломного проекту	26.05.23-31.05.23	Виконав
11.	Захист дипломного проекту	20.06.2023	

Здобувач _____ Михайлова Ірина Анатоліївна

Керівник роботи _____ Пилипенко Людмила Миколаївна

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень	6
Анотація	7
Annotation	9
Вступ	11
Розділ 1. Огляд літератури	12
1.1 Аналіз стану ринку виробництва стандартизованих пробіотичних мікробних препаратів в Україні	12
1.2 Обґрунтування необхідності у пробіотичних препаратах в Україні, форми та технології їх отримання	26
Розділ 2 Техніко-економічне обґрунтування	38
2.1. Потреба у цільовому продукті	38
2.2 Обґрунтування вибору біологічного агента	40
2.3 Характеристика біологічного агента - <i>Bifidobacterium bifidum</i>	41
2.4 Форми пробіотичних препаратів та основні вимоги організації виробництва пробіотиків	48
2.5 Склад та якість поживних середовищ для культивування біфідобактерій	56
2.6 Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва	61
Розділ 3 Опис технології отримання препарату <i>Bifidobacterium bifidum</i>	67
3.1 Характеристика складу традиційних відомих поживних середовищ для культивування біфідобактерій	67
3.2 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	67
3.3 Культивування біфідобактерій на традиційних та модифікованому поживному середовищі	68
3.4 Характеристика кінцевої продукції виробництва	74
Розділ 4 Продуктовий розрахунок і матеріальний баланс біосинтезу	78
4.1 Продуктовий розрахунок виробництва пробіотичного препарату <i>Bifidobacterium bifidum</i>	78
4.2 Матеріальний баланс на одну ферментацію (партію)	78
4.3 Розрахунок технологічного обладнання	78
4.4 Перелік обладнання для отримання пробіотичного препарату <i>B. bifidum</i>	81
4.5 Викладення удосконаленого технологічного процесу	90
4.6 Схема постадійного контролю біосинтезу <i>Bifidobacterium bifidum</i>	100
Розділ 5. Охорона праці і навколишнього середовища	103
5.1 Методи очищення стічних вод при виробництві пробіотичного препарату <i>Bifidobacterium bifidum</i>	103
5.2 Виробничі фактори, що впливають на навколишнє середовище	106

КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3				
Зм.	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата
Студент		Михайлова І. А.		
Консультант				
Керівник		Пилипенко Л.М.		
Зав. кафедри		Капрельянц Л.В.		
РОЗРАХУНКОВО-ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА				
		Стадія	Аркуш	Аркушів
			1	4
ОНТУ, група БіОз - 51				

Розділ 6. Економічні розрахунки	108
6.1 Маркетингове дослідження ринку пробіотиків	108
6.2 Впровадження у виробництво результатів дослідження	111
6.3 Очікувані економічні результати	111
6.4 Визначення інноваційного бюджету та інвестицій у виробництво	116
Висновки	120
Перелік джерел посилання	121
Додатки	127
Додаток А Постадійна схема технології отримання пробіотичного препарату <i>Bifidobacterium bifidum</i>	128
Додаток Б Апаратурна схема технології отримання пробіотичного препарату <i>Bifidobacterium bifidum</i>	129
Додаток В Ферментер у розрізі	130
Додаток Г Результати економічних розрахунків	131
Додаток Д НДРС. Апробація різних типів поживних середовищ для культивування мікроорганізмів <i>B.bifidum</i>	132

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БАД	Біологічно активна добавка
ВООЗ, WHO	Всесвітня організація охорони здоров'я
ГОС	α -галактоолігосахариди
ДНК	Дезоксирибонуклеїнова кислота
ДР	Допоміжна робота
КДС	казеїново-дріжджове середовище
КЛС	Кукурудзяно-лактозне середовище
МКБ	Молочнокислі бактерії
ОНАХТ	Одеська національна академія харчових продуктів
ТП	Технологічний процес
ФОС	Фруктоолігосахариди
ФПХ	Функціональний продукт харчування
ШКТ	Шлунково-кишковий тракт
FAO	Продовольча і сільськогосподарська організація ООН
GRAS	Generally regarded as safe/ Повністю безпечний
GMP	Good manufacturing practice/ Належна виробнича практика
WGO	Всесвітня гастроентерологічна організація
K _T	Контрольна точка технічна
K _{мб}	Контрольна точка мікробіологічна
<i>B.bifidum</i>	

АНОТАЦІЯ

Проблематиці дисбактеріозу на даний час приділяється багато уваги як медиками, так і науковцями. За даними вітчизняної та світової статистики, із даною проблемою постійно стикається 80 - 90% людей різних вікових та соціальних груп. Світовий ринок фармацевтичних препаратів для лікування дисбіотичних порушень на сьогодні складає понад 90 млрд у.о. і постійно зростає. Тим не менше, універсального та однозначно дієвого вирішення даної проблеми не знайдено.

Найчастіше для нормалізації складу мікробіоти кишківника практикується пероральне введення пробіотиків. За визначенням FAO/WHO, пробіотики - це живі мікроорганізми, що при вживанні в адекватних кількостях виявляють оздоровлюючий ефект на організм людини.

Більшість спеціалістів та дослідників схиляються до ідеї використання в якості пробіотиків представників нормальної мікробіоти. Частіше за все це молочнокислі бактерії родів *Bifidobacterium* і *Lactobacillus*.

Пробіотики на основі біфідобактерій – одні з високоефективних і необхідних організму препаратів. Найбільшу популярність має пробіотичний препарат Біфідобактерин. Він належить до групи препаратів, що складаються з монокультури живих клітин, у даному випадку біфідобактерій.

Важливою проблемою є те, що в Україні понад 90% фармацевтичного ринку в галузі пробіотиків на основі біфідобактерій займають іноземні фірми, а менше 10% – вітчизняні виробники і це завдає відчутного удару по фінансовій складовій України.

Актуальність даної теми пов'язана з тим, що у всьому світі біологічні бактеріальні препарати позитивно зарекомендували себе у якості засобів профілактики та лікування дисбактеріозу шлунково-кишкового тракту. Але в останні роки ефект від їх застосування значно знизився, спостерігається нестабільність результатів лікування та профілактики. З огляду на це особливої актуальності набуває розробка пробіотичних препаратів

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		7

покращеної якості для корекції порушень мікробіоти, що слугуватиме досить ефективним, доступним та поширеним методом на сьогодні.

Мета роботи – зменшення імпортозалежності України у пробіотичних препаратах шляхом вдосконалення технології препарату мікроорганізмів *Bifidobacterium bifidum* культивуванням біфідобактерій на поживних середовищах з модифікованим складом.

Для досягнення поставленої мети доцільним є вирішення наступних завдань:

1. Провести аналіз літератури щодо виробництва стандартизованих мікробних препаратів.
2. Обґрунтувати необхідність у пробіотичних препаратах.
3. Охарактеризувати форми та технології їх отримання, склад та якість поживних середовищ.
4. Описати особливості технології отримання пробіотичного препарату Біфідобактерину.
5. Оцінити ріст *Bifidobacterium bifidum* на традиційних відомих поживних середовищах для культивування біфідобактерій та порівняти цей показник при використанні поживних середовищ з модифікованим складом.
6. Провести технологічні розрахунки й аналіз інвестиційної привабливості проєкту.
7. Розробити технологічну і апаратурну схеми виробництва.
8. Обґрунтувати вибір конструкції ферментера та здійснити його технологічний та конструктивний розрахунки.
9. Надати висновки та рекомендації щодо застосування препарату мікроорганізмів *Bifidobacterium bifidum*.

Ключові слова: стандартизовані пробіотичні препарати, *Bifidobacterium bifidum*, пробіотичний препарат мікроорганізмів *Bifidobacterium bifidum*, поживні середовища, технологічний процес.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		8

ABSTRACT

Both doctors and scientists are currently paying a lot of attention to the problem of dysbacteriosis. According to national and world statistics, 80-90% of people of different age and social groups constantly face this problem. Today, the world market of pharmaceuticals for the treatment of dysbiotic disorders is more than 90 billion U.S. dollars. and is constantly growing. Nevertheless, a universal and unambiguously effective solution to this problem has not been found.

Most often, oral administration of probiotics is practiced to normalize the composition of intestinal microflora. According to the FAO/WHO definition, probiotics are living microorganisms that, when used in adequate quantities, have a health-improving effect on the human body. Most specialists and researchers are inclined to the idea of using representatives of normal microflora as probiotics. Most often, these are lactic acid bacteria of the genera Bifidobacterium and Lactobacillus.

Probiotics based on bifidobacteria are one of the highly effective and essential drugs for the body. The most popular probiotic preparation is Bifidobacterin. It belongs to a group of preparations consisting of a monoculture of living cells, in this case bifidobacteria.

An important problem is that in Ukraine more than 90% of the pharmaceutical market in the field of probiotics based on bifidobacteria is occupied by foreign companies, and less than 10% by domestic manufacturers, and this causes a significant blow to the financial component of Ukraine.

Actuality of this theme is related to that in the whole world biological bacterial preparations positively showed oneself in quality of facilities of prophylaxis and treatment of dysbacteriosis of gastrointestinal tract. But in recent year an effect from their application went down considerably, there is instability of results of treatment and prophylaxis. Taking into account it the special actuality is acquired by development of preparations of probiotic of the improved quality for the correction of violations of microflora that will serve as an effective enough, accessible and widespread method for today.

					<i>КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3</i>	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		9

The aim of work was to reduce Ukraine's import dependence in probiotic preparations by improving the technology of the preparation of *Bifidobacterium bifidum* microorganisms by cultivating bifidobacteria on nutrient media with a modified composition.

For the achievement of the put aim expediently there is a decision of the following:

1. To conduct the analysis of literature in relation to the production of the standardized microbial preparations.
2. To ground a necessity for preparations of probiotic.
3. To describe forms and technologies of their receipt, composition and quality of nourishing environments.
4. To describe the features of technology of receipt of preparation of probiotic of *Bifidobacterium bifidum* microorganisms.
5. To estimate the height of *Bifidobacterium bifidum* on the traditional known nourishing environments for cultivation of bifidobacteria and to compare this index at the use nourishing environments with the modified composition.
6. To conduct technological calculations and analysis of investment attractiveness of project.
7. Develop technological and hardware schemes of production.
8. To justify the choice of a fermenter and to carry out its technological and constructive calculations
9. To provide conclusions and recommendations regarding the use of the preparation of *Bifidobacterium bifidum* microorganisms.

Key words: standardized probiotic preparations, *Bifidobacterium bifidum*, probiotic preparation of microorganisms *Bifidobacterium bifidum*, nutrient media, technological process.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
						10
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		

ВСТУП

У важких воєнних умовах, в яких опинилась Україна, поряд з фізичною безпекою провідне значення має біолого-фізіологічна безпека населення. Стресові ситуації, порушення режимів, складу та якості харчового раціону під час тривоги, вибухів та інших воєнних дій призводять до пригнічення імунного захисту організму людини. На сьогоднішній день важливим питанням є також вирішення проблеми захворюваності людей на дисбактеріоз, що складає 90% всього населення. Пропонується широкий вибір продуктів, лікарських засобів, спрямованих на відновлення нормального біоценозу організму людини [5].

На сучасному фармацевтичному ринку представлено великий асортимент препаратів на основі нормальної мікробіоти людини. Нині пробіотики розглядаються як ефективний метод відновлення складу та функції біоценозу людини. А поява нової науково обґрунтованої інформації з цього питання створює величезні перспективи для поповнення арсеналу фармацевтичного ринку новими ефективними бактеріотерапевтичними препаратами [5]. Пробиотики, крім дисбактеріозу, призначаються й з 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 [3, 5, 42].

Основною групою мікроорганізмів, які використовуються у складі сучасних пробіотичних препаратів є бактерії родів *Bifidobacterium* і *Lactobacterium*. Це пов'язано з тим, що вони є основною мікробіотою кишківника людини [42, 51].

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		11

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Аналіз стану ринку виробництва стандартизованих пробіотичних мікробних препаратів в Україні

В останні роки на організм людини постійно впливає цілий комплекс несприятливих факторів, які змінюють нормальне функціонування основних систем життєдіяльності. У зв'язку з цим постало питання про способи конструювання і відновлення оптимальної мікробіоти, тобто мікроекології та ендоекології макроорганізму, що, у свою чергу, спровокувало появу і виробництво цілого ряду мікробних препаратів, спрямованих на корекцію і відновлення нормофлори [66].

В науковій літературі та офіційних документах, які мають відношення до проблем мікроекології, а також у повсякденному житті широку популярність отримала біотерапія. Теоретично це поняття існувало вже досить давно і вперше було описано І. І. Мечниковим, який виявив позитивний ефект, що мають молочнокислі бактерії на організм людини [52, 66].

Взагалі біотерапія включає поняття «пробіотики», «пребіотики», «симбіотики». Не слід ототожнювати ці поняття, адже кожне з них включає різні за походженням і функціональною активністю компоненти [66, 98].

«Пробіотики» – природні ад'юванти, живі мікроорганізми, введення яких в організм людини сприяє підтриманню і відновленню біологічного балансу його нормофлори і має позитивний ефект [89].

«Пребіотики» – представляють собою речовини або дієтичні інгредієнти, які вибірково стимулюють ріст і біологічну активність мікроорганізмів у кишечнику [84].

«Симбіотики» – комбінація пробіотичного та пребіотичного компонентів з метою інтенсифікації позитивного ефекту на організм [87].

За деякими літературними даними до біотерапії також відносять «пробіотичні продукти» – ферментовані за допомогою бактерій

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		12

кисломолочні

продукти [24, 52]. Відповідно ДСТУ 2212-93 «Молочна промисловість. Молоко і кисломолочні продукти. Терміни та визначення», кисломолочний продукт – це молочний продукт, який утворюється сквашуванням молока чи вершків, пахти, сироватки чистими культурами молочнокислих бактерій з можливим додаванням культур дріжджів, оцтовокислих чи пропіоновокислих бактерій, харчових добавок [12]. Ведення в склад кисломолочних продуктів спеціально селекціонованих штамів молочнокислих бактерій, біфідобактерій сприяє кращому засвоєнню кальцію в організмі людей різних вікових груп, зниженню рівня холестерину в крові, забезпечує фізіологічну необхідність у вітамінах, амінокислотах, антиоксидантах, активізує утворення мікробної лактази [54, 66]. Цей клас можна віднести лише до засобів профілактики розладів шлунково-кишкового тракту.

Розподіл сучасних препаратів (продуктів) для відновлення нормальної мікробіоти наведено у табл.1.1 [16, 55].

Таблиця 1.1

Розподіл сучасних препаратів (продуктів) для відновлення нормальної мікробіоти [55]

№	Група препаратів (продуктів)	Діючі компоненти
1.	Пробіотики (фармацевтичні препарати та біологічно активні добавки)	Жива біомаса фізіологічної мікробіоти
2.	Препарати на основі інактивованих мікроорганізмів	Інактивована біомаса пробіотичної мікробіоти
3.	Пребіотики	Речовини, що сприяють селективному збільшенню популяції фізіологічної мікробіоти кишечника
4.	Синбіотики/симбіотики	Комплекс пробіотика та пребіотика
5.	Препарати метаболітного типу	Фізіологічно активні метаболіти пробіотичної мікробіоти
6.	Продукти функціонального харчування	Живі мікроорганізми, їх метаболіти та/або інші сполуки, що позитивно впливають на кишкову мікробіоту
7.	Нутрицевтики	Поживні субстрати, що сприяють оздоровленню кишечника

Пребіотики. Поняття «пребіотики» було вперше застосоване англійським професором в області харчової мікробіології Р. Гібсоном, який замінив префікс «про» на «пре», тобто «для». Нині цей термін використовується для визначення препаратів немікробного походження, здатних здійснювати позитивний вплив на організм людини через селективну стимуляцію росту або метаболічної активності нормальної мікробіоти [13, 31]. Тобто, пребіотики – речовини, які селективно стимулюють ріст і підсилюють метаболічні процеси нормальної мікробіоти (насамперед біфідобактерій і лактобацил). Вони поліпшують різноманітні фізіологічні функції і метаболічні реакції, пов'язані з функціонуванням симбіотичної мікробіоти (стійкість до інфекцій, зниження ризику виникнення злоякісних новоутворень, поліпшення біозасвоєння кальцію і магнію, колонізація кишечника немовлят корисними мікроорганізмами, зниження рівня сироваткового холестерину і т. п.).

Найбільша кількість пребіотичних речовин міститься в натуральних харчових продуктах.

За походженням пребіотики бувають (за Левицьким А. П. зі співавт.) [31]:

1. рослинного походження (фітопребіотики): інулін і фруктоолігосахариди (ФОС), α -галактоолігосахариди (ГОС), β -глікани (харчові волокна), резистентні крохмалі, вітаміни, фітолізоцим, інгібітори протеаз і амілаз;

2. тваринного походження (зоопребіотики): олігосахариди молока, глікопептиди молока, лактоферин, олігопептиди, інгібітори протеаз і амілаз, лізоцим;

3. штучні: лактулоза, модифіковані крохмалі.

Б. А. Шендеров зі співавторами проаналізували речовини, здатні стимулювати ріст нормальної мікробіоти, і розділили пребіотики на наступні групи [16]:

					<i>КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3</i>	<i>Аркуш</i>
<i>Зм</i>	<i>Аркуш</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		14

- моносахариди і спирти (ксиліт, мелібіоза, ксилоза, ксилобіоза, рафіноза, сорбіт та ін.);
- олігосахариди (лактоулоза, лацитол, соєвий олігосахарид, латітололігосахарид, фруктоолігосахариди, галактоолігосахариди, ізомальтоолігосахарид, диксилоолігосахарид та ін.);
- полісахариди (пектини, пулулан, декстрин, інулін, хітозан, β -глюкани та ін.);
- ферменти (β -галактозидаза мікробного походження, протеази сахароміцетів та ін.);
- пептиди (соєві, молочні та ін.);
- амінокислоти (валін, аргінін, глютамінова кислота тощо);
- антиоксиданти (вітаміни групи В, вітамін Е, аскорбінова кислота, α -, β -каротини, інші каротиноїди, глутатіон, убіхінол, солі селену та ін.);
- ненасичені жирні кислоти (ейкозапентаєнова кислота та ін.);
- органічні кислоти (пропіонова, оцтова, лимонна та ін.);
- рослинні та мікробні екстракти (морквяний, картопляний, кукурудзяний, рисовий, гарбузовий, часниковий, дріжджовий та ін.);
- інші (лецитин, параамінометилбензойна кислота, лізоцим, лактоферин, глюконова кислота, крохмальна патока, пектини різноманітного походження тощо).

До відбору пребіотиків для лікарських засобів також існують певні вимоги [13]:

- вони не повинні розщеплюватись ферментами макроорганізму;
- не повинні всмоктуватися у верхніх відділах тонкого кишечника;
- повинні бути селективним субстратом для індигенної мікробіоти;
- повинні покращувати стан мікробіоценозу і перешкоджати розвитку дисбіотичних порушень;
- повинні позитивно впливати на макроорганізм.

Тому наразі використовують полі- і олігофруктани, соєві олігосахариди, галактоолігосахариди, ізольовані з природних джерел або

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		15

одержані біотехнологічним чи синтетичним методами. Найчастіше для створення пребіотичних препаратів застосовують [16, 31]:

- олігосахариди, в тому числі N-ацетилглюкозамін, глюкозу, галактозу, олігомери, фукози або інші глікопротеїни, які в значній пропорції складають грудне молоко, і є специфічними факторами для росту біфідобактерій [16];

- лактулозу – синтетичний дисахарид, що є поживним субстратом для цукролітичних бактерій та понад 40 років застосовується для стимуляції росту лактобацил у немовлят. У процесі бактеріального розкладення лактулози на коротколанцюгові жирні кислоти (молочну, оцтову, пропіонову, масляну) знижується рН вмісту товстої кишки. За рахунок цього підвищується осмотичний тиск, що супроводжується затримкою рідини у просвіті кишки та посиленням її перистальтики. Використання лактулози призводить до підвищення бактеріальної маси і супроводжується активною утилізацією аміаку та азоту амінокислот [61];

- інулін – полісахарид фруктозану, внаслідок гідролізу якого утворюється глюкоза. Міститься у бульбах та коренях жоржини, топінамбуру, артишоків і кульбаб. Стимулює ріст та активність біфідо- та лактобактерій, підвищує всмоктування кальцію у товстому кишечнику [26];

- фруктоолігосахариди не перетравлюються ферментами макроорганізму і практично не засвоюються у верхніх відділах травного тракту. Селекційно стимулюють ріст біфідобактерій та пригнічують ріст клостридій і фузобактерій, підвищують всмоктування кальцію, магнію, заліза та цинку, знижують концентрацію холестерину; галактоолігосахариди містяться в молоці, соєвих бобах та інших рослинах. Стимулюють ріст біфідобактерій та інших анаеробів, не впливають на чисельність аеробів. Підвищують стійкість біфідобактерій до кислого середовища шлунка [27];

- резистентні крохмалі – крохмалі, які важко засвоюються в тонкому кишечнику. Їх кількість у харчових продуктах знаходиться в межах від 0 до 25%. Стимулюють ріст біфідобактерій, сприяють утворенню органічних

кислот, підвищують імунітет, знижують ризик розвитку запальних процесів і злоякісних новоутворень, виступають у ролі ентеросорбентів [16];

- харчові волокна – за структурою є біополімерами (целюлоза, геміцелюлоза, пектинові речовини, лігнін, хітин, хондроїтин, колаген, еластин тощо). Мають властивості сорбенту (сорбують стерини, жовчні кислоти, токсини, бактерії). Відносяться до полісахаридів. Найбільш цінним для розвитку анаеробної флори є пектин, оскільки при його мікробному розщепленні утворюються такі метаболіти як оцтова і пропіонова кислоти [48].

Крім зазначених, в якості пребіотичних субстанцій використовуються також різні блокатори адгезії та інгібітори росту патогенних і опортуністичних мікроорганізмів (лектини, антиадгезини, модулятори синтезу секреторних імуноглобулінів, дефензини різних типів, структурні компоненти пробіотичних мікроорганізмів, їх метаболіти тощо) [62].

Синбіотики. Поєднання пробіотиків з пребіотичними речовинами привело до створення нових біологічно активних препаратів «синбіотиків», в яких живі мікроорганізми поєднуються з субстратами, що стимулюють їх ріст [14, 16]. Однак розглядати ці препарати як синбіотики можна лише в тому випадку, якщо будь-які живі чи вбиті мікроорганізми, їх структурні компоненти, метаболіти, які позитивно впливають на функціонування мікробіоти господаря, сприяють їх кращій адаптації до умов середовища проживання в конкретній екологічній ніші. Тобто, у складі таких препаратів пребіотик повинен не включатися в метаболізм мікроорганізму, а служити стартовим компонентом його росту [14].

Таким чином, синбіотики – це препарати, отримані за допомогою раціональної комбінації пробіотиків і пребіотиків [32].

Біологічні препарати на основі метаболітів і структурних компонентів клітин мікроорганізмів.

До фармацевтичних засобів на основі метаболітів і структурних компонентів клітин мікроорганізмів відносять препарати [16, 55, 95]:

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		17

- метаболітного типу – створені на основі комплексу фізіологічних продуктів обміну мікроорганізмів, що виконують одну з головних ролей у підтримці мікроекологічного гомеостазу в біотопах людини. Головна увага при цьому приділяється синтезованим нормофлорою летким жирним кислотам, особливо масляній, пропіонової і оцтовій;
- на основі структурних компонентів клітин – містять структурні компоненти клітин *Lactobacillus spp.*, частіше за все болгарської палички (*L. delbrueckii ssp. bulgaricus*). Ці препарати мають імуномодельючі властивості («Деодан», «Бластен») та здатні підвищувати протипухлинний імунітет онкологічних хворих («Бластолізін»).

Біологічні препарати на основі інактивованої біомаси пробіотичної мікробіоти.

Насамперед, це препарати на основі інактивованих клітин молочнокислої мікробіоти [55, 95]: Їх дія заснована на пригніченні адгезивних властивостей потенційно небезпечної мікробіоти за рахунок екранування інактивованими пробіотичними клітинами специфічних рецепторів на епітелії. Встановлено, що для прояву антагоністичної ефективності інактивованим пробіотиком його необхідно використовувати у десятикратному об'ємі порівняно з препаратами на основі живих мікроорганізмів. Найвірогідніше, що основний пробіотичний ефект інактивованих клітин полягає у стимулюючому впливі на імунну систему, оскільки вони є потужним джерелом імуногенних сполук, зокрема пептидоглікану [73].

Препарати на основі комплексу живої мікробіоти та біологічно активних компонентів, продукти функціонального харчування.

Двічі лауреат Нобелівської премії Лайнус Полінг вперше запропонував розглядати продукти харчування та їх окремі компоненти як фармацевтичні препарати. Він розробив та активно впроваджував концепцію оздоровчого ефекту продуктів функціонального харчування, яка ґрунтується на тому, що біологічно активна плівка, яка вкриває слизові оболонки усіх біотопів

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		18

травного тракту, є первинною мішенню для будь-якого харчового субстрату, що надходить у організм перорально. Тому продукти, які позитивно впливають на склад і функції нормальної мікробіоти, у фізіологічних концентраціях сприятимуть покращенню стану фізичного і психічного здоров'я та зменшенню ризику виникнення захворювань [55, 95].

Функціональне харчування – це продукти спеціального призначення природного або штучного походження, призначені для систематичного щоденного споживання, які сприяють поповненню нестачі в організмі енергетичних, пластичних або регуляторних харчових субстанцій [20].

Функціональні продукти харчування – продукти, призначені для систематичного застосування у складі харчових раціонів всіма віковими категоріями здорового населення з метою зниження ризику захворювань, пов'язаних з харчуванням, збереження та покращення здоров'я за рахунок наявності в їх складі фізіологічно функціональних харчових інгредієнтів [17].

Функціональний харчовий інгредієнт – це речовина або комплекс речовин тваринного, рослинного, мікробного, мінерального походження або ідентичних натуральним речовинам, а також живі мікроорганізми, яким притаманна здатність чинити позитивний вплив на одну або кілька фізіологічних функцій, процеси обміну речовин в організмі людини у разі споживання у кількостях 10-50% від добової фізіологічної потреби.

Функціональний продукт харчування (ФПХ) та біологічно активні добавки (БАД) відрізняються лише формою, у якій функціональні інгредієнти доставляються до організму людини. Якщо доставка відбувається у подібній до лікарської формі для перорального застосування (таблетки, капсули, порошки тощо), то це – БАД. Якщо ж функціональний інгредієнт потрапляє до організму у формі традиційної харчової речовини, то мова йде про ФПХ [23].

Вважають, що харчовий продукт може бути віднесений до продуктів функціонального харчування, якщо вміст у ньому певного функціонального харчового інгредієнта становить не менше 30% його добової потреби [16].

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		19

Нутрицевтики. Це біологічно активні добавки, якими збагачують продукти для підвищення їх поживної цінності. Вони, як і ліки, проходять клінічні випробування і відповідають стандартам якості, прийнятим у сучасній фармакології [55, 95].

До нутрицевтиків відносяться вітаміни, коротколанцюгові та середньоланцюгові жирні кислоти, поліненасичені жирні кислоти (ω -3 та ω -6), макро- (кальцій, фосфор, сірка, калій, натрій, магній) і мікроелементи (цинк, марганець, залізо, хром, селен, йод, фтор, мідь, кобальт), амінокислоти (глутамін, аргінін та ін.), моно- і дисахариди, харчові волокна (целюлоза, пектини). Тобто речовини, яких організм потребує щодня, але отримує не завжди. Фізіологічно цінними їх властивостями є: імуномодулюючі, цитопротекторні та антиоксидантні функції, участь у обмінних процесах, забезпечення епітеліоцитів енергетичним і пластичним матеріалом, вплив на гормональний обмін [16].

Найбільш вивченими нутрицевтиками є глутамін, аргінін та інші амінокислоти, коротколанцюгові та середньоланцюгові жирні кислоти, поліненасичені ω -3- та ω -6-жирні кислоти.

Пробіотики. Помітний прогрес, що спостерігається останніми роками в області розробки нових видів пробіотиків, розширює можливості клініки в оптимізації методів пробіотичної профілактики і терапії. Проте багато питань, що стосуються конструювання нових поколінь пробіотиків і вибору серед величезного арсеналу засобів пробіотичного ряду ефективного препарату для кожного конкретного клінічного випадку, залишаються досить проблематичними [11, 49].

Зростаючий інтерес до методів пробіотичної терапії при недостатньо досконалій системі розробки і вживання препаратів даної серії призвів до хаотичного насичення ринку пробіотиків України всілякими засобами, ефективність і безпека багатьох з яких не доведена. Тому питання промислового виробництва стандартизованих мікробних препаратів є досить актуальним.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		20

Незважаючи на відносну простоту промислового виробництва пробіотиків, що зводиться до вирощування одного або кількох мікроорганізмів-пробіонтів на відповідних поживних середовищах з подальшим виготовленням фармакологічних форм, кожний окремий мікроорганізм або композиція потребують ретельного дослідження, опрацювання режимів і перебігу технологічного процесу одержання пробіотичних препаратів.

За промисловою класифікацією пробіотики поділяють на п'ять поколінь.

I покоління – монокомпонентні препарати. Містять один штам бактерій (біфідобактерій, лактобактерій та ін.);

II покоління – антагоністи, що самостійно елімінуються з організму. Складаються зі спорових бацил та дріжджеподібних грибів;

III покоління – комбіновані препарати. Містять кілька штамів бактерій. Бактерії, що входять до його складу можуть відноситись до одного або різних видів та посилюють дію один одного;

IV покоління – синбіотики – комбінація пробіотичного і пребіотичного компоненту;

V покоління – рекомбінантні або генно-інженерні пробіотики створені на основі генно-інженерних штамів мікроорганізмів, їх структурних компонентів та метаболітів, мають задані характеристики [26].

На фармацевтичному ринку України пробіотики представлені доволі широко. Переважно це препарати, які містять біфідо-, колі- та лактобактерії, дріжджі. На сьогодні широкому колу споживачів доступні сотні пробіотиків, пробіотичних продуктів харчування, харчові добавки, та їх кількість, зареєстрованих в Україні, постійно зростає. В наш час на українському ринку лікарських препаратів переважають імпортовані пробіотичні препарати. В Україні пробіотики виробляють лише на одному заводі “Біофарма”. Закордонні фірми займають біля 90% українського фармацевтичного ринку в цій області [66]. Найбільш відомі пробіотичні препарати, що

					<i>КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3</i>	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		21

використовуються і користуються популярністю в Україні, наведено у табл.1.2.

Сьогодні нагромаджено величезний обсяг фактичного матеріалу щодо проблем створення, стандартизації та застосування пробіотиків. Широкий спектр позитивної оздоровчої дії на макроорганізм пробіотичних препаратів обумовлює здебільшого різноспрямоване вивчення їхніх біологічних властивостей.

Таблиця 1.2

Перелік пробіотиків, зареєстрованих в Україні [66]

Особливості препарату	Назва препарату
Монокомпонентні	Лактобактерин (суха речовина), Україна
	Біфідумбактерин (суха речовина), Україна
	Біо-Гая (краплі), Швейцарія
	Колібактерин (суха речовина), Україна
	А-Бактерин (суха речовина), Україна
Полікомпонентні	Біфіформ-бебі (краплі), Данія
	Лінекс (капсули), Астрія
	Біфіформ (капсули), Італія
	Біфікол (флакони), Україна
Комбіновані (симбіотики)	Лактовіт форте (капсули), Великобританія
	Лацидофіл (капсули), Україна, Румунія
	Біфіформ дитячий (капсули), Румунія, Данія
	Лактив-ратіофарм (капсули, порошок, флакони), Італія
	Біфіформ комплекс (таблетки), Данія
Рекомбінантні	Субалін (суха речовина), Україна
	Хілак, хілак-форте (краплі), Німеччина
Самоелімінуючі	Бактисубтіл (капсули), Франція
	Ентерожерміна (питні ампули), Франція, Італія
	Біоспорин (суха речовина), Україна
	Ентерол (суха речовина), Франція

Усебічне дослідження властивостей мікробних культур, перспективних для створення пробіотичних препаратів спрямовано на стабілізацію технологічного процесу, посилення пробіотичних властивостей за рахунок біологічно активних речовин, що синтезуються спеціально підібраними штамми лактобактерій, розширення асортименту продукції [11].

Створено міжнародні рекомендації для оцінки пробіотичних властивостей харчових продуктів і біопрепаратів, мета яких систематизувати наявну сукупність критеріїв відбору пробіотичних продуцентів для проведення поетапної роботи з обраним штамом і встановлення можливості його промислового використання. У межах Європейського Союзу процеси створення пробіотиків і продуктів функціонального харчування для потреб людини, які розробляються після 1997 року, регулюються директивами European Novel Food Regulation (258/97/ЕЕС). Пробіотичні препарати для тварин проходять дослідження згідно з вимогами SCAN (Scientific Committee on Animal Nutrition) [11].

З 2002 року базовими є рекомендації, розроблені робочою групою Продовольчої і сільськогосподарської організації ООН (FAO) та Всесвітньою організацією охорони здоров'я (WHO), у вигляді єдиної системи оцінки пробіотиків і пробіотичних властивостей продуктів функціонального харчування [33, 49, 95]. Етапи оцінки подані на рис. 1. 1.

Згідно з цією схемою перше місце серед критеріїв відбору посідає чітка ідентифікація пробіотичного продуценту. Потім проводиться характеристика його функціональних властивостей і безпечності в тестах *in vitro*, які підтверджуються в доклінічних дослідженнях на тваринах. Далі штам/пробіотик тестується стандартними клінічними методами:

- етап 1 (оцінка безпечності),
- етап 2 (оцінка ефективності),
- етап 3(порівняльний аналіз).
- останній блок схеми містить рекомендації до маркування пробіотичних продуктів.

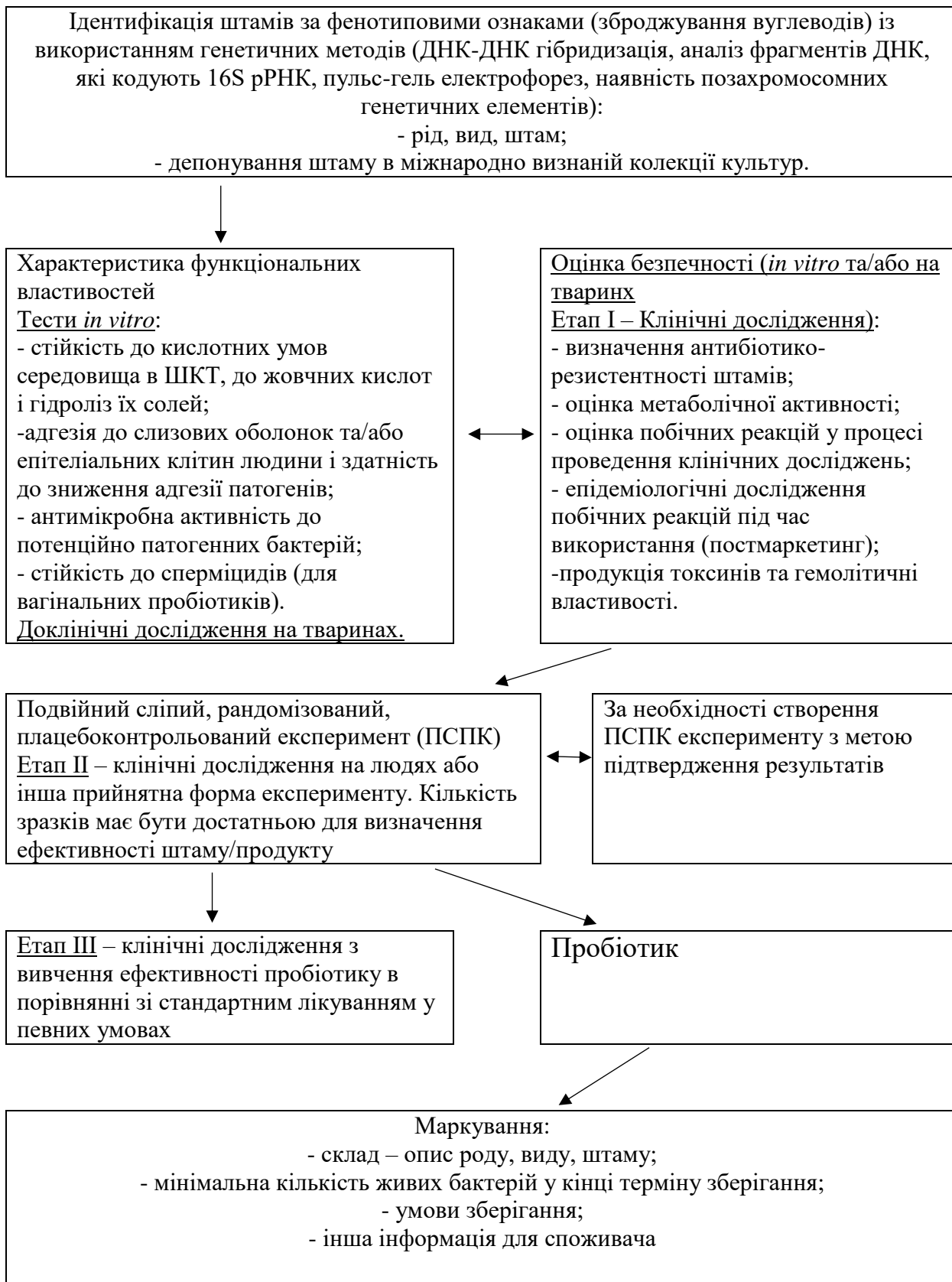


Рис. 1.1. Етапи оцінки пробіотичних штамів для створення стандартизованих препаратів згідно FAO/WHO [11]

Ефективність мікробних препаратів, у тому числі і пробіотичних, визначається сукупністю біологічних властивостей штамів, які входять до складу препаратів [29].

Важливу роль на підприємствах біотехнологічного виробництва відіграє контроль готового препарату. Не викликає сумніву необхідність розробки нових, більш удосконалених методів контролю пробіотичних препаратів, одним з яких є використання під час контролю якості еталонних зразків [9].

Відомий спосіб створення еталонних зразків для контролю якості бактерієвмісних препаратів передбачає отримання галузевих стандартних зразків шляхом валідації властивостей виробничих штамів мікроорганізмів.

Якість препаратів, які містять мікроорганізми, формується на усіх етапах технологічного процесу, починаючи з штамів, поживних середовищ та умов культивування, заморожування, способу висушування і до форми випуску, умов зберігання, транспортування. Від ефективності усіх цих етапів прямо залежать основні показники якості препарату — специфічна активність та автентичність, які визначаються кількістю живих бактерій та їхньою специфічністю у дозі препарату. Пробіотичні препарати мають бути стандартними і стабільними протягом визначеного терміну їх використання, показники якості мають відповідати вимогам нормативної документації [69].

Досвід роботи контролюючих організацій показав, що ефективність оцінки якості комерційних препаратів залежить від наявності стандартних зразків різних рівнів: міжнародних, державних, галузевих, виробничих, які використовують для стандартизації та порівняння показників якості препаратів, що досліджуються [29].

Ефективність дії пробіотичних препаратів залежить від ферментативних та імунобіологічних властивостей виробничого штаму. Робочі стандартні зразки штамів на виробництві або безпосередньо виробничі штами, що містяться у пробіотичних препаратах, неохоче надаються для контрольних лабораторій в якості еталонного матеріалу. Тому

					<i>КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3</i>	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		25

виникає потреба створення відповідних еталонних зразків під час випробувань бактерієвмісних препаратів у контрольних лабораторіях.

Сучасний контроль якості препаратів є складною, всеохоплюючою системою, без успішного функціонування якої неможливо ефективно вирішувати проблеми якості.

Якість визначається дією багатьох випадкових, місцевих та суб'єктивних факторів. Для запобігання впливу цих факторів на рівень якості необхідна система управління якістю. При цьому необхідні не окремі розділення та епізодичні умови, а сукупність дій постійного впливу на процес виробництва з метою підтримки відповідного рівня якості.

Контроль готового препарату – це остаточний етап контролю у процесі виробництва, на якому здійснюється комплексна перевірка, а за необхідності – і регулювання, налагодження всього технологічного процесу отримання готового препарату. Це контроль пробіотичних препаратів, за результатами якого приймається рішення про підготовку їх до поставок чи використання [3, 39].

1.2 Обґрунтування необхідності у пробіотичних препаратах в Україні, форми та технології їх отримання

Біохімічну, метаболічну та імунологічну рівновагу, необхідну для забезпечення здоров'я людини, підтримують численні популяції мікроорганізмів, що заселяють її органи та системи. Сукупність цих популяцій називається нормофлорою. Порушення рівноваги, пов'язане зі зміною кількісного і/або якісного складу мікробіоти кишечника, вважають клініко-лабораторним синдромом дисбактеріозу кишечника. Даний синдром призводить до розвитку метаболічних та імунологічних порушень і часто проявляється розвитком кишкових дисфункцій [5].

Склад мікробіоти кишечника змінюється залежно від різних ділянок травної системи. Крім того, на її склад впливають й інші фактори, такі як вік, стать, харчування, спосіб життя людини тощо.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		26

У шлунково-кишковому тракті бактерії розподілені по-різному: в шлунку ріст мікроорганізмів обмежується кислим середовищем (низький рівень рН), уздовж тонкої кишки їх концентрація поступово збільшується, а найбільше бактерій у товстому кишечнику. Анаеробні бактерії становлять 95% всієї мікробіоти кишечника, тоді як аеробні – лише 5% [30, 94].

Ротова порожнина, шлунок, тонка і товста кишка – кожен з цих ділянок заселяють різні типи бактерій. Бактерії в ротовій порожнині виконують захисну функцію. Бактерії шлунково-кишкового тракту (лактобацили, ентерококи, бактероїди та інші) – бар'єр на шляху інфекцій.

Мікробіота кишечника – це колонії добре організованих і вузькоспеціалізованих мікроскопічних організмів, які налічують понад сотню видів, передусім бактерій. Мікробіота закріплюється на слизовій оболонці кишечника і утворює на ній щільну своєрідну біологічну плівку. Мікробіота своєю збалансованою роботою підтримує нормальну життєдіяльність всього організму. Вона перебуває у симбіотичних, тобто постійних, взаємовигідних і незамінних відносинах зі своїм господарем – людиною [34].

Мікробіота слизової оболонки кишечника здатна самостійно відновлюватися і підтримувати якісну і кількісну рівновагу серед своїх численних колоній. При нормальному фізіологічному стані людини взаємини організму і мікробіоти носять, в цілому, симбіотичний характер, який сформувався і закріпився в процесі еволюційного розвитку [14]. Симбіотичні відносини між людиною і мікроорганізмами, що живуть у слизовій його кишечника, дають змогу обом існувати в оптимальному режимі, чинячи успішний опір дії агресивного навколишнього середовища, що постійно змінюється.

Основною функцією мікробіоти кишечника вважають утворення та підтримання динамічної рівноваги в мікробних колоніях та узгодження їхньої взаємодії з макроорганізмом. Цей процес називається колонізаційною резистентністю. Саме така своєрідна екологічна мікросистема може успішно протидіяти атакам хвороботворних мікроорганізмів зовнішнього середовища.

					<i>КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3</i>	<i>Аркуш</i>
<i>Зм</i>	<i>Аркуш</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		27

Коли стан екосистеми порушується, виникає збій у всіх системах і органах [35].

Відомо, що фізіологічний стан багато в чому визначається характером харчування. В наш час структура харчування у багатьох країнах характеризується незбалансованістю за складом нутрієнтів, вітамінів, мікроелементів, харчових волокон, підвищеним вмістом антибактеріальних компонентів, консервантів, стабілізаторів, гормонів, нерегулярністю, різкими змінами раціонів і режимів харчування [14, 66].

Окрім цього чинника, люди й тварини зазнають впливу цілого комплексу несприятливих факторів, що впливають на нормальне функціонування основних систем життєдіяльності: з одного боку, погіршення екологічної обстановки, збільшення кількості стресових ситуацій, а з іншого – масове безконтрольне застосування хіміотерапевтичних препаратів, у тому числі антибіотиків. Очевидно, що найістотніший внесок у парадигму сучасної захворюваності привнесло широке використання антибактеріальних засобів. З моменту відкриття антибіотиків неухильно зростає їхнє споживання у всіх країнах. На світовому ринку нині річна вартість виготовлення антибіотиків перевищує 10 млрд доларів США. Загалом антибіотики відіграли свою, безсумнівно, позитивну роль у боротьбі з інфекційними захворюваннями. Але незабаром стало зрозуміло, що у них є побічні ефекти [50].

Найзначущішим з урахуванням поширеності наслідком антибіотикотерапії вважають дисбактеріоз кишечника. Навіть короткочасний щоденний контакт з антимікробними препаратами призводить до зміни кишкового мікробіоценозу, що часто можна спостерігати, наприклад, у працівників фармацевтичних виробництв. Важливо й те, що паралельно зі зростанням споживання антибіотиків зростає захворюваність нозологічними формами, що вважалися рідкісними, казуїстичними в доантибіотиковий період [34].

Все це викликає зниження адаптаційних можливостей організму, активує процеси симпатико-адреналової системи, що, в свою чергу, обумовлює нейрогуморальні зміни за рахунок дисбалансу продукування таких нейромедiatorів як серотонін, дофамін, норадреналін, гістамін та інших. Всі ці речовини, крім своїх основних функцій, також впливають і на мікробіоту, яка населяє і мешкає в організмі. Мікробіота реагує на зміни психоемоційного стану або стану здоров'я людини, і, в свою чергу, виробляє медіатори, що впливають на специфічну й неспецифічну резистентність організму [14, 78].

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), число людей зі зниженим функціональним станом імунної системи постійно збільшується, що обумовлює загострення хронічних захворювань, у тому числі й викликаних умовно-патогенними мікроорганізмами.

У зв'язку з цим і виникли питання про способи відновлення оптимальної мікробіоти, тобто мікроекології і ендоекології макроорганізму [66, 68].

Теоретично ці поняття існують вже давно, і вперше були описані знаменитим вченим, лауреатом Нобелівської премії – І. І. Мечниковим, який провів дослідження можливості відновлення кишкової мікробіоти за допомогою молочнокислої палички *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* та виявив позитивний ефект від впливу молочнокислих бактерій на організм людини [69]. Ще у 1907 році І. І. Мечніков писав, що численні асоціації мікробів, які заселяють кишечник, значною мірою визначають духовне і фізичне здоров'я людини. Він довів, що шкіра й слизові оболонки вкриті біоплівкою, яка містить сотні видів мікробів. Розвиток ідеї І. І. Мечникова щодо цілеспрямованої зміни складу мікробіоти шлунково-кишкового тракту шляхом ентерального введення культур молочнокислих бактерій в якості антагоністів гнильних мікробів обумовив розвиток такого напрямку як «біотерапія» і призвів до створення нового класу бактеріальних препаратів – пробіотиків, а в подальшому й пребіотиків та синбіотиків [14].

Останнім часом увага приділяється новому напрямку, пов'язаному із розробкою і впровадженням препаратів-парапробіотиків, основою яких є нежиттєздатні пробіотичні мікроорганізми. Нещодавні дослідження довели, що навіть нежиттєздатні мікроорганізми можуть бути корисними для споживачів так само, як і їхні життєздатні аналоги [74, 101].

Вперше термін «пробіотик» було використано у 1953 р. німецьким бактеріологом, гігієністом та нутрицевтиком В. Коллатом для визначення органічних і неорганічних добавок, необхідних для відновлення здоров'я пацієнтів, які страждали від недостатнього харчування внаслідок введення до раціону надлишкової кількості високоочищених продуктів. Пізніше, у 1965 р. D. M. Lilly та R. H. Stillwell використали термін «пробіотик» для назви фармакологічних препаратів або біологічно активних добавок (БАД), що містять культуру нормальної мікробіоти людини і позитивно впливають на мікробний склад організму господаря [69].

Упродовж років існувало декілька трактувань терміну «пробіотик» [14, 16]:

- американські ветеринари Деніель М. Ліллі та Росаліє Г. Стілвелл (1965): пробіотики – це мікробні метаболіти, що стимулюють ріст мікроорганізмів;
- італійсько-американський вчений Георг Спері Сперті (1971): пробіотики – це екстракти будь-яких тканин, що стимулюють ріст мікроорганізмів;
- англійський вчений Р. Б. Паркер (1974): пробіотики – це мікробні препарати, що регулюють мікробну екологію травного тракту;
- англійський експерт в області мікробної екології Рой Фуллер (1989): пробіотики – це препарати з живих мікроорганізмів, що здійснюють на макроорганізм сприятливий ефект через корекцію кишкової мікробіоти;
- Рой Фуллер (1995): пробіотики – це препарати з живих мікроорганізмів або стимулятори росту мікробного, тваринного або

рослинного походження, що здійснюють сприятливий вплив на індигенну мікробіоту;

- англійський професор в області харчової мікробіології Гленн Р. Гібсон та бельгійський професор-медик Марсель Роберфройд (1995): пробіотики – це харчові добавки мікробного походження, що проявляють свої позитивні властивості на макроорганізм через регуляцію кишкової мікробіоти;

- канадський професор мікробіології та імунології Грегор Рейд (2003): пробіотики – це живі мікроорганізми, застосування яких в адекватних дозах приводить до покращення здоров'я хазяїна;

- вчений Б. А. Шендеров: пробіотики – це живі мікроорганізми та речовини мікробного походження, які за природного способу введення чинять позитивний вплив на фізіологічні, біохімічні та імунні реакції організму хазяїна (людини або тварини) внаслідок оптимізації та стабілізації його мікробіоти. Поняття «пробіотик» визначають як антонім до антибіотиків, тобто «промотор життя». Синонімом терміну «пробіотик» є термін еубіотик».

Всесвітня гастроентерологічна організація (WGO, 2008 р.) дає наступні визначення для термінів: «пробіотики» – живі мікроорганізми, які при введенні в адекватній кількості здійснюють позитивний ефект на організм хазяїна; «пребіотики» – речовини, що не всмоктуються та здійснюють позитивний фізіологічний ефект на хазяїна селективно стимулюючи необхідний ріст або активність кишкової мікробіоти; «синбіотики» – продукти, які містять про- та пребіотики [49].

Наразі, згідно з визначенням ВООЗ (WHO, 2009 р.), пробіотики – апатогенні для людини бактерії, які мають антагоністичну активність щодо патогенних і умовно патогенних бактерій та забезпечують відновлення нормальної мікробіоти [16].

Окрім наведених існує термін «продукти функціонального харчування», який введено в наукову літературу в 1989 р. в Японії. Під ним

розуміють такі продукти природного походження, які при щоденному застосуванні певною мірою регуляторно впливають на організм у цілому або на певні системи і органи та їх функцію [11]. Перелік компонентів функціонального харчування постійно доповнюється. Першочергову роль у ньому відведено штамам живих лакто- і біфідобактерій. Деякі вчені наголошують на подібності між продуктами функціонального харчування і симбіотиками за їх кінцевим ефектом на макроорганізм.

Сьогодні нагромаджено величезний обсяг фактичного матеріалу щодо проблем створення та застосування пробіотиків. Широкий спектр позитивної оздоровчої дії на макроорганізм пробіотичних препаратів обумовлює здебільшого різноспрямоване вивчення їхніх біологічних властивостей. Усебічне дослідження властивостей мікробних культур, перспективних для створення пробіотичних препаратів спрямовано на стабілізацію технологічного процесу, посилення пробіотичних властивостей за рахунок біологічно активних речовин, що синтезуються спеціально підібраними штамами мікроорганізмів, розширення асортименту продукції [25, 55, 59].

Практично в кожній статті, присвяченій дослідженню потенційних пробіотичних продуцентів, автори наводять перелік критеріїв їх відбору, який формується виходячи з фармакокінетики і фармакодинаміки пробіотичних препаратів у організмі людини чи тварин, складу (моно-, поліпрепарат) та призначення пробіотику (для лікування ШКТ, вагінальні тощо). Узагальнюючи літературні дані щодо оцінки потенціалу пробіотичних штамів мікроорганізмів переважно *in vitro* (критерії відбору пробіотичних культур), можна виділити такі:

1. Активне вибіркоче пригнічення росту патогенних культур мікроорганізмів [11, 73].

Окрім цього, штами в складі комплексних біопрепаратів повинні випробуватись на симбіотичність з визначенням характеру бактеріоцино опосередкованих конкурентних взаємодій між ними *in vitro* та *in vivo* [14] і

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		32

характеризуватися взаємодоповнюючим спектром антагоністичної дії щодо широкого ряду патогенних мікроорганізмів [60, 76].

Вирізняється ще одна ознака, пов'язана з антагоністичним потенціалом молочнокислих бактерій (МКБ) – це вплив штамів лактобактерій на фактори патогенності та персистенції бактеріальної флори, а саме: каталазу, антилізоцимну та антикомплементарну активність ентеробактерій. Визначення цих характеристик дає змогу розкрити особливості міжбактеріальних взаємодій і розшифрувати механізми формування мікробіоценозів організму людини [11].

2. Цитоадгезивні властивості та колонізуюча здатність [90].

3. Висока стійкість до несприятливих умов зовнішнього середовища. Вважається, що дані щодо стійкості штамів МКБ до жовчі, фенолу, шлункового соку, протеолітичних ферментів, лізоциму, хлориду натрію та спроможність розвиватись в умовах високих значень рН опосередковано свідчать про здатність штамів приживлюватись у кишечнику [11, 91].

4. Висока синтетична активність, зокрема продукція антимікробних речовин [31], холестеринемічна активність [57].

Наявність ферментативної активності, пов'язаної зі здатністю пробіотичних мікроорганізмів активно засвоювати широкий спектр нутрієнтів (для оральних пробіотиків), які присутні в травному тракті внаслідок біохімічних процесів травлення їжі в організмі людини і тварин [70].

В огляді, присвяченому проблематиці неоднозначності ролі нормофлори [11], автори застерігають, що у розробці нових препаратів-пробіотиків необхідно враховувати наявність у селекціонованих штамів небажаних властивостей: підвищеної метаболічної активності, здатності синтезувати проміжні біополімери.

5. Нешкідливість для макроорганізму і аутомікробіоти в цілому [11, 44]. Нечисленні відомості щодо негативних впливів МКБ на організм людини пов'язані, насамперед, з їх карієсогенною дією, септемією, здатністю викликати ревматоїдні васкулярні хвороби та інфекційні ендокардити.

Нешкідливість потенційного продуценту включає: генетичну віддаленість від патогенних бактерій, відсутність жодного фактора патогенності (зокрема, токсичності, токсигенності), відсутність вираженої здатності до транслокації з кишечника у внутрішні органи, неінвазивність [26, 69].

6. Стимуляція (модуляція) специфічних та неспецифічних механізмів резистентності макроорганізму, антимутагенність, антиканцерогенність [11, 63, 65, 93].

7. Антибіотикостійкість [86].

8. Генетична стабільність [11].

9. Технологічність [4, 67, 92] – висока швидкість росту, використання для життєдіяльності дешевих нехарчових субстратів, стійкість до забруднення сторонньою мікробіотою; збереження властивостей під час виробництва і в готовому препараті.

10. Походження продуценту пробіотику. Деякі автори [14, 15] наголошують на необхідності заселення біотопів людини виключно мікроорганізмами-представниками облигатної мікробіоти. Ще більш бажано, щоб продуцент був виділений з нормальної флори жителів тієї території, де буде застосовуватись препарат. Перспективною є також розробка методів корекції мікробіоти кишечника за допомогою аутоштамів індигенних мікроорганізмів.

Не дивлячись на значне розширення асортименту пробіотиків, не всі з них відповідають перерахованим вимогам.

Пробіотики повинні характеризуватися доведеною клінічною ефективністю.

Не дивлячись на загальну думку, що склалася про доцільність використання пробіотиків, клінічний ефект ряду препаратів не доведений, а механічно переноситься з інших препаратів схожого видового складу. Це недопустимо, оскільки серед величезного різноманіття штамів всередині кожного виду мікроорганізмів лише небагато з них володіють високою

					<i>КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3</i>	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		34

пробіотичною ефективністю. Тому стверджувати про наявність у пробіотика певного спектру властивостей можна лише на підставі клінічних досліджень конкретного засобу пробіотичної серії [51, 72, 73].

За однією з класифікацій препарати пробіотиків, які використовуються нині у клінічній практиці, поділяються на декілька поколінь (табл. 1.3).

Таблиця 1.3

Пробіотичні препарати різних поколінь [72]

Пробіотики	Склад мікробіоти	Концентрація клітин, КУО/дозу
I покоління – пробіотики на основі монокультур облігатної абор факультативної нормофлори		
Біфідумбактерин	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	10 ⁹
Колібактерин	<i>Escherichia coli</i>	10 ⁹
Лактобактерин	<i>Lactobacillus fermentum</i> або <i>Lactobacillus plantarum</i>	10 ⁸
II покоління – 2-4 компонентні пробіотики на основі облігатної, факультативної або транзитornoї флори		
Біфікол	<i>Bifidobacterium bifidum</i> + <i>Escherichia coli</i>	10 ⁸
Біфіформ	<i>Bifidobacterium longum</i> + <i>Enterococcus faecium</i>	10 ⁷
Лінекс	<i>Bifidobacterium infantis</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Enterococcus faecium</i>	10 ⁷
Капсули йогурту	<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Lactobacillus delbrueckii ssp.</i> <i>bulgaricus</i> + <i>Bifidobacterium bifidum</i> + <i>Streptococcus thermophilus</i>	10 ⁹
Симбіолакт композитум	<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Lactobacillus casei</i> + <i>Bifidobacterium bifidum</i> + <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	10 ⁹
III покоління – пробіотики на основі транзитornoї мікроорганізмів		
Бактисубтил	<i>Bacillus cereus</i> IP5832	10 ⁹
Біоспорин	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Bacillus licheniformis</i>	10 ⁹
Ентерол-250	<i>Saccharomyces boulardii</i>	10 ⁷
А-бактерин (Аеробакт)	<i>Aerococcus viridans</i>	10 ⁸
Лактовіт форте	<i>Lactobacillus sporogenes</i> + <i>Bacillus coagulans</i>	10 ⁸
IV покоління – синбіотики (комбінація пробіотиків і пребіотиків) та іммобілізовані пробіотики		
Екстралакт	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10 ⁸
Біфілакт-екстра	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	10 ⁸
Біфідумбактерин форте	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	10 ⁷
Пробіфор	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	10 ⁸

Продовження табл.1.3

V покоління – препарати на основі рекомбінантних генно-інженерних штамів		
Субалін	<i>Bacillus subtilis</i>	10^9
VI покоління – полікомпонентні пробіотики на основі лактобацил і біфідобактерій		
Probiotic	<i>Lactobacillus</i>	10^9
Symbiolact	<i>Lactobacillus + Bifidobacterium</i>	10^{10}
Біфідум-Мульти-1,2,3	<i>Bifidobacterium</i>	10^9
Полібактерин	<i>Lactobacillus + Bifidobacterium</i>	10^9
VII покоління – мультипробіотики		
Симбітер	<i>Bifidobacterium + Lactobacillus + Propionibacterium + Lactococcus</i>	10^9
Симбітер концентрований		10^{13}
Симбітер-2		10^{12}
Симбітер-М		$10^9 - 10^{12}$
Апібакт		10^{12}
IX покоління – парaproбіотики (нежиттєздатні пробіотичні мікроорганізми)		

Одним з найбільше довгостроково використовуваних у світі пробіотичних препаратів є Yakult. Препарат був розроблений і випущений японської компанією Yakult Honsya. Ще з 30-40 років ХХ століття, коли Мінору Широ (доктор медицини департаменту мікробіології, школи медицини Кіотського імперського університету) виділив і одержав виробничі штами лактобактерій (*Lactobacillus casei*). Вживання Yakult по усьому світу становило 23 млн флаконів щодня. В 2008 році з'явилися повідомлення про побічну дію препарату. Вчені з Медичного центру Утрехтського університету (Голландія) оприлюднили інформацію про смерть 24 людей у період з 2004 по 2007 роки в ході дослідження впливу пробіотиків на хворих панкреатитом, у якому брали участь 296 людей. На думку дослідників, деякі з померлих могли б бути живі дотепер, якби не вживали пробіотик. Вчені попередили, що важкохворим необхідно уникати вживання пробіотичних продуктів. Виробники затверджують, що напій Yakult є продуктом харчування, а не лікарським препаратом. Вони пояснили, що дослідники вводили препарат безпосередньо в кишечник зондом, а це не відповідає звичайному шляху введення, описаному в рекомендаціях. Нідерландським докторам була дана вказівка не прописувати пробіотик пацієнтам із

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		36

хворобами внутрішніх органів, що перебувають у відділеннях інтенсивної терапії або, що одержують харчування через крапельницю [9].

На сьогоднішній день розглядаються чотири типи побічних ефектів, які можуть бути пов'язані з пероральним вживанням пробіотиків: розвиток інфекційних процесів; метаболічні розлади; надмірна імуностимуляція лімфатичного апарату кишечника; формування нових клонів мікроорганізмів за рахунок передачі генів, відповідальних за експресію чинників патогенності [9, 36].

Перелічені побічні ефекти переважно залежать від біологічних властивостей штамів мікроорганізмів, які використовуються у складі препарату. Тому питання обґрунтування видового і штамового складу пробіотиків мають виняткове значення [73].

					<i>КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3</i>	Аркуш
<i>Зм</i>	<i>Аркуш</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		37

РОЗДІЛ 2

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

2.1 Потреба в цільовому продукті

Як відмічалось в літогляді, в Україні пробіотик Біфідумбактерин виробляє невелика кількість фармацевтичних підприємств. Це ВАТ «БІОФАРМА», "ООО НВП АРІАДНА", ООО "Vivo-activ".

Незважаючи на достатньо широкий асортимент імпортованих і вітчизняних пробіотиків, актуальними залишаються проблеми їх вдосконалення, які полягають у:

- дослідженні фізіології перспективних виробничих штамів з метою підбору поживних середовищ для їх культивування;
- визначенні процесів сорбції пробіотичних бактерій як загальнобіологічного процесу;
- вивченні ролі продуктів метаболізму та біологічно активних речовин мікробної клітини для визначення природи адгезинів, механізму антагоністичної активності;
- розробці технології виготовлення комплексних препаратів на основі консорціумів бактерій з широким спектром антагоністичної активності;
- дослідженні синергічної та інгібіторної дії різних видів і штамів пробіотичних бактерій;
- розробці оптимальної форми випуску препаратів (порошок, таблетки із захисним покриттям, капсули, гранули, суппозиторії, мазі, гелі тощо), яка б забезпечувала збереження біологічних властивостей пробіотиків та простоту і зручність їх застосування;
- вдосконаленні методів контролю антагоністичної активності препаратів, що містять життєздатні мікробні клітини, та розробці методів визначення вмісту живих мікроорганізмів [59, 99].

Серед науково-практичних напрямків, пов'язаних з мікробною екологією, перспективними для розробки та реалізації є:

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		38

- розробка експресних молекулярних методів дослідження складу й активності мікробіоценозів людини і тварин;
- пошук нових пребіотичних функціональних субстанцій;
- дослідження й деталізація молекулярних, біохімічних та інших механізмів ефективності пробіотиків, пребіотиків і синбіотиків у профілактиці, лікуванні та збільшенні термінів ремісії за різних захворювань, асоційованих з дисбалансом мікробної екології травного тракту;
- поглиблена оцінка нешкідливості пробіотичних препаратів і продуктів харчування, які використовуються людиною;
- дослідження можливості використання представників нормальної мікробіоти як носіїв для конструювання різного роду бактеріальних і вірусних вакцин;
- створення сучасних біотехнологічних підприємств з виготовлення пробіотиків, пребіотиків, синбіотиків, стартерних заквасок прямого внесення, антибіотиків, імуномодуляторів, вітамінів, біогенно активних пептидів, біосенсорів тощо на основі представників нормальної анаеробної мікробіоти людини й тварин [15].

Нині опрацьовано й оптимізовано умови культивування біфідобактерій у реакторах в умовах промислового виробництва. Це дає змогу одержувати суху біомасу біфідобактерій у вигляді синхронної популяції мікроорганізмів з концентрацією понад 10^{11} КУО/г препарату.

Одним із перших бактеріотерапевтичних препаратів для відновлення нормальної мікробіоти є моноштамовий пробіотик або монопробіотик – Біфідобактерин [34].

Біфідобактерин належить до пробіотиків I покоління. Біфідобактерин належить до антидіарейних мікробних препаратів (A07F A10) [27, 58].

Терапевтичний ефект Біфідобактерину визначає наявність в ньому живих біфідобактерій, що є антагоністами по відношенню до широкого спектру патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів і, тим самим, нормалізуючи мікробіоту кишечника. Високий кількісний рівень

біфідофлори і її переваги в мікробіоценозі досягається при використанні біфідобактерину, що нормалізує діяльність травного тракту, покращує розвиток затяжних форм кишкових захворювань, підвищує неспецифічну резистентність організму.

Препарат необхідний для лікування та профілактики дисбактеріозу, а також хронічних колітів, на які страждають приблизно 90 % людей в Україні [2, 41], що за теперішніми відомостями складає приблизно 32 млн дорослих та дітей. Курс лікування для дорослих становить по 1 флакону × 2 – 3 рази на день до трьох неділей, для немовлят – 1 фл. × 2 рази 10 – 14 днів. Флакон вміщає в себе 5 або 10 доз. Тобто курс лікування для дорослих становить 63 флакони, а для немовлят 28 флаконів. Загальна кількість флаконів становить 91, а річна потреба становить 2912000000 фл./рік. З урахуванням того, що лікування цим препаратом приймають третина дитячого населення та незначно менша за них частина дорослого населення, потребу у цьому пробіотичному препараті визначали у кількості 800 000 000 флаконів на рік.

2.2 Обґрунтування вибору біологічного агенту

Ключовою групою мікроорганізмів з доведеними корисними властивостями для здоров'я людини є сахаролітичні, аспорогенні, грампозитивні бактерії родів *Bifidobacterium* і *Lactobacillus*. Біфідобактерії лідирують у складі сучасних пробіотиків, що обумовлено постійною присутністю високих рівнів популяцій даних мікроорганізмів у складі нормобіоценозів людини і накопиченням величезної кількості даних, що свідчать про ключову фізіологічну роль представників вказаної групи анаеробів у функціонуванні мікроекологічної системи здорових людей [29, 32, 73].

Біфідобактерії і переважна кількість видів лактобацил відносяться до групи GRAS (generally regarded as safe) і розглядаються як нешкідливі для здоров'я людини. Тому безпека пробіотиків на основі даних таксонів мікробіоти зазвичай не викликає сумнівів [100].

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		40

Після того як у середині 60-х років ХХ ст. група німецьких дослідників установила, що біфідобактерії за певних умов можна культивувати в молоці, ці мікроорганізми почали використовувати для виготовлення не тільки ферментованих лікувальних продуктів харчування, а й фармакопейних препаратів [26].

Нині опрацьовано й оптимізовано умови культивування біфідобактерій у реакторах в умовах промислового виробництва. Це дає змогу одержувати суху біомасу біфідобактерій у вигляді синхронної популяції мікроорганізмів з концентрацією понад 10^{11} КУО/г препарату.

Одним із перших бактеріотерапевтичних препаратів для відновлення нормальної мікробіоти є моноштамовий пробіотик або монопробіотик – Біфідобактерин [34].

2.3 Характеристика біологічного агента - *Bifidobacterium bifidum*

За класифікацією мікроорганізмів згідно «Визначника бактерій Бергі» (1997), *Bifidobacterium bifidum* віднесені до сімейства *Actinomycetaceae* як грампозитивні неспороутворюючі палички неправильної форми відділу *Firmicutes* царства *Procaryotae* [22]. Однак за сучасною таксономічною класифікацією, заснованою на особливостях нуклеотидного складу нуклеїнових кислот бактерій, зокрема за аналізом 16S рРНК, таксономічний статус *Bifidobacterium bifidum* змінено і зараз вона займає таке положення [58]:

Домен: Бактерії

Тип: *Firmicutes*

Клас: *Actinobacteria*

Порядок: *Bifidobacteriales*

Родина: *Bifidobacteriaceae*

Рід: *Bifidobacterium*

Вид: *bifidum*.

З усіх бактерій саме вони найбільш розповсюджені в організмі людини. Велика частина розташовується в товстій кишці ($10^8 - 10^{11}$ КУО/г) як основна

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		41

пристіночна і провітна мікробіота. Клітини *B. bifidum* являють собою поліморфні палички з біфуркаціями на одному чи двох кінцях, які розташовуються у вигляді скупчень або окремих клітин, парами, ланцюгами, полісадом чи розетками.

Нерухомі, спор, капсул, слизових шарів не утворюють. Грампозитивні, забарвлення часто нерівномірне. Ці палички досить варіабельні. На ранніх стадіях розвитку в популяції спостерігаються переважно паличкоподібні клітини довжиною до 8 мкм, товщиною в середньому 0,4 – 0,5 мкм. На рис. 2, 3 представлено морфологію клітин біфідобактерій.

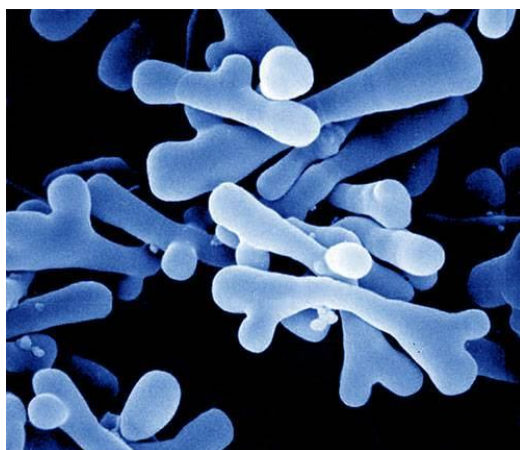


Рис. 2.1. Мікрофотографія біфідобактерій [53].

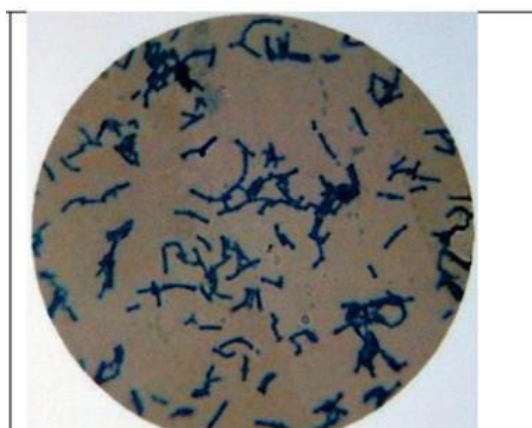


Рис. 2.2. Морфологія клітин *Bifidobacterium bifidum* (світлопольна мікроскопія, x900) [71].

У пізніший термін культивування в популяціях переважають ланцюги чи конгломерати клітин, частина з подвоєними кінцями, які продовжують рости в довжину. Ці особливості морфології біфідобактерій можна вважати реакцією на умови середовища, в якому вони мешкають, що виявляється на клітинному і популяційному рівнях.

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 рН середовища. При симбіотичному рості, чи під впливом високих концентрацій гліцину, D-амінокислот чи антибіотиків, активних у відношенні клітинної стінки, можуть спостерігатися клітини неправильної форми [8, 46].

На щільних поживних середовищах *B. 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 [79]. На 0,72 %-вому печінковому і гідролізатно-молочному агарах біфідобактерії утворюють колонії у вигляді зерна чи у вигляді дисків розміром до 3 мм у діаметрі [58].

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

В рідких поживних середовищах біфідобактерії ростуть по всій висоті об'єму, крім зони аеробіозу. Пігментів не утворює. Деякі види можуть рости в атмосфері повітря, збагаченого 10% CO₂ [27].

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

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		43

запах продуктів бродіння, утворюючи різні леткі сполуки, такі як діацетил і його похідні, а також сірководень [53].

Не ростуть при $\text{pH} < 4,5$ чи $> 8,5$. Здатні рости при температурі від 20°C до 45°C , однак оптимальною є температура $38\pm 1^\circ\text{C}$.

Біфідобактерії здатні утворювати набряклі, інволюційні, кулясті форми при розвитку за несприятливих умов: невідповідна кислотність середовища ($\text{pH} < 5,5$ чи $> 8,5$), температура культивування ($t < 20^\circ\text{C}$ чи $> 45^\circ\text{C}$), нестача поживних компонентів середовища, присутність кисню. Поява плеоморфних розгалужених клітин активується і катіонами одновалентних лужних металів - K^+ , Na^+ , Li^+ , Rb^+ , Cs^+ , а також виключенням із поживного середовища будь-якої з чотирьох амінокислот (DL-аланін, DL-аспарагінова кислота, L(+)-глутамінова кислота, DL-серин), суміш яких запобігає появі розгалужених клітин [7].

Клітинна стінка біфідобактерій 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 [28].

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. окислот: 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 [79].

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 [79].

Головними жирними кислотами, які входять до складу клітинної стінки, є пальмітинова, пальмітолеїнова і олеїнова, співвідношення яких варіює в залежності від складу поживного середовища і температури культивування. Наявність в складі клітинної стінки фосфатидилгліцерола, дифосфатидилгліцерола і аланінфосфатидилгліцерола є специфічною для біфідобактерій ознакою. Важливим компонентом клітинної стінки є ліпотьохоеві кислоти. Саме вони визначають більшість пробіотичних властивостей біфідобактерій, і зокрема *B. bifidum*.

Цитоплазматична мембрана – двошарова, шириною 75-85 А⁰. Нуклеоїд і рибосоми мають структуру, типову для усіх прокариот [47, 79].

Розмноження відбувається шляхом формування поперечних перегородок. На рівні сформованої септи в поперечній перегородці клітинна стінка товща від бічної. Поступово в культурах з'являється сильно виражений поліморфізм бактеріальних клітин. Розмноження може відбуватися одночасно чи послідовно на деяких ділянках тіла однієї клітини чи її відростків, внаслідок чого утворюються ланцюги клітин нерівномірної довжини без ознак відокремлення особин, що входять у їх склад.

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

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		45

ефірах жирних кислот, спеціальних ростових добавках та інших факторах росту [21].

B. bifidum є гетероферментативною паличкою [47].

Основним джерелом вуглецевого живлення *B. bifidum* 1 є моно- і дисахариди – глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза. Вуглекислий газ також відіграє важливу роль у життєдіяльності біфідобактерій. Він може навіть у деяких випадках замінити такі фактори росту як амінокислоти (аспарагінову кислоту, фенілаланін, гістидин) і вітаміни (біотин) [81].

Щодо азотного живлення, то складні органічні форми азоту *B. bifidum* не синтезують, тому ці форми необхідно вносити у поживне середовище [27].

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. [19].

Потреби біфідобактерій в біологічно активних речовинах великі й різноманітні: *B. bifidum* у якості компонентів поживного середовища, потребують біотин, пантотенову кислоту, цистеїн, рибофлавін, пуринові і піримідинові основи, пептиди, амінокислоти, кофермент А, олігосахариди, деякі ненасичені жирні кислоти та ін. З амінокислот потрібно лізин, пролін, серин, аланін, аспарагінова і глутамінова кислоти [97].

Для забезпечення нормального росту і розвитку *B. bifidum* потрібен ряд неорганічних сполук міді, заліза, натрію, калію, фосфору, йоду, сірки, магнію і, особливо, марганцю [47].

Тип енергетичного метаболізму – бродіння. Тип бродіння – гетероферментативне молочнокисле бродіння. Усі біфідобактерії зброджують глюкозу, галактозу і фруктозу з утворенням органічних кислот. Бродіння здійснюється за схемою, наведеною на рис. 2.3. Штами, виділені від людини, зброджують лактозу, лактулозу і N- ацетилглюкозамін. Органічні кислоти, що утворюються при зброджуванні вуглеводів, є оцтова і L(+) молочна кислота. Також, у процесі бродіння, утворюються домішки

мурашиної, бурштинової кислот й етанолу. Масляна і пропіонова кислоти, вуглекислий газ у процесі бродіння не утворюються [79].

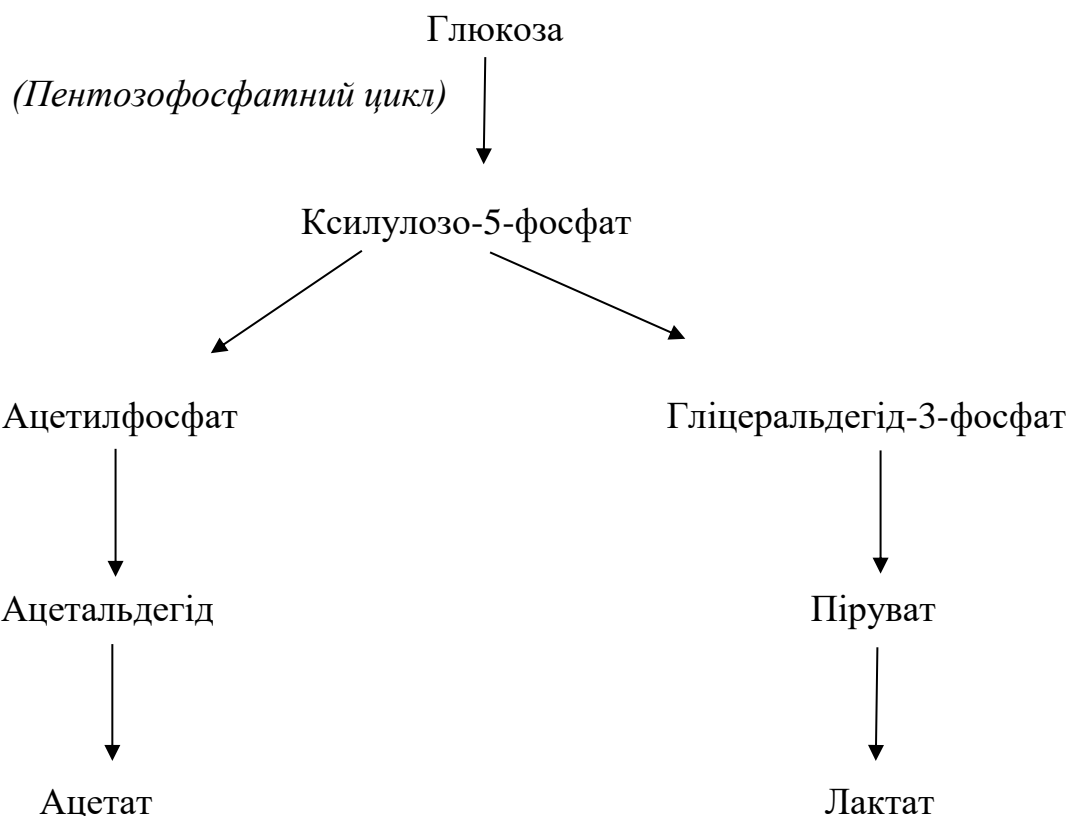


Рис. 2.3 - Схема хімічних перетворень, здійснюваних *B.bifidum*.

Бактерії роду *Bifidobacterium* – хемоорганогетеротрофи (організми, які отримують енергію і карбон з органічних сполук). Збродження вуглеводів здійснюється за фруктозо-6-фосфатном шляхом. Особливістю цього шляху є, з одного боку, участь ферменту фруктозо-6-фосфат-фосфокетолази, з іншого - те, що тільки тут одночасно важливу роль відіграє транскетолаза і ксилулозо-5-фосфат фосфокетолаза [47, 79].

B. bifidum не утворюють каталазу, H_2S , не відновлюють нітрати до нітритів, не володіють уреазною активністю, не розріджують желатин.

Особливості метаболізму *B. bifidum* є 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 [83].

Необхідно відмітити, що біфідобактерії є дуже вимогливі до складу середовищ культивування. Вони не ростуть на синтетичних середовищах.

Оптимальний ріст штамів спостерігається при анаеробних чи мікроаерофільних умовах. Стимулювати ріст може збільшена концентрація вуглекислого газу [81].

2.4 Форми пробіотичних препаратів та основні вимоги організації виробництва пробіотиків.

За механізмом дії препарати пробіотиків є багатофакторними лікувальними засобами. Вони мають антагоністичну активність щодо широкого спектру патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, здійснюють коригуючий вплив на біоценоз та стимулюють репаративні процеси в кишечнику [5, 6, 15, 60].

За формою випуску пробіотики діляться на дві групи – рідкі та сухі. Сухі пробіотики - це ліофільно висушена біомаса у флаконах або ампулах; ліофільно висушена біомаса у желатинових капсулах; супозиторії ректальні та вагінальні з ліофільно висушеної біомаси; ліофільновисушена біомаса, пресована в таблетки, вкриті розчинною у кишечнику оболонкою; лінгвальні таблетки, що розсмоктуються під язиком [59, 72, 75, 77, 82]. Термін зберігання сухих препаратів більш тривалий, ніж рідких, до того ж вони менш залежні від умов зовнішнього середовища і, таким чином, не вимагають суворого дотримання критеріїв зберігання. Тому багато фірм, особливо зарубіжних, вважають доцільним виробляти саме сухі пробіотики, які також набагато зручніші і в транспортуванні. Недолік сухих пробіотиків полягає в тому, що при ліофілізації бактерії втрачають частину своїх корисних властивостей, а після вживання препарату необхідно від 1 до 8 – 10 годин для переходу бактерій із анабіозу в активну форму та початку дії [14].

Рідкі пробіотики – це бактерії «з активною життєвою позицією», тобто вони зберігають всі свої цінні властивості і починають діяти відразу ж після потрапляння в організм. Більшість дослідників вважають, що краще у складі пробіотиків застосовувати живі культури мікроорганізмів [15, 56, 72, 80, 85]. Проте, по-перше, це вимагає суворого дотримання умов придатності,

по-друге, термін зберігання у зазначених препаратів коротший за ліофілізовані аналоги – не більше трьох місяців.

Рідкі форми пробіотиків можуть складатися з [15]:

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

Характеристику рідких та ліофільно висушених пробіотиків наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Характеристика різних форм пробіотиків [58]

Властивості	Рідкі пробіотики	Ліофільно висушені пробіотики
Антагоністична активність щодо патогенної та умовно-патогенної мікробіоти	Висока	Низька та середня
Швидкість росту	Висока за мінімальної транслокації з травного тракту у внутрішнє середовище макроорганізму	Низька
Протеолітична активність ферментів, що беруть участь у розщепленні білка коров'ячого молока	Є	Немає
Фізіологічний стан мікроорганізмів	Можливість введення у препарат лише фізіологічно активних клітин, яким властива здатність до розмноження в кишечнику під час прийому препарату	Неможливість контролю фізіологічного стану мікроорганізмів
Додатковий лікувальний фактор	Є (продукти метаболізму фізіологічно активних мікроорганізмів, наприклад, жирні кислоти)	Немає

Рідка форма відкриває можливості введення пробіотичних препаратів різними шляхами (вагінально, перорально, інтраназально, ректально тощо). Також вони можуть бути використані для полоскання ротової порожнини, їх можна наносити на шкіру і на волосяну частину голови, в залежності від необхідності відновлення мікроекології різних біологічних ніш [15].

Препарати дозують у межах 10^7 – 10^{10} КУО на дозу. Необхідність внесення такої великої концентрації заквашувальних культур зумовлена негативною дією на них несприятливих факторів різного генезу. Тому однією з актуальних проблем удосконалення технології пробіотиків є створення препаратів, які б забезпечували сприятливі умови для бактерій упродовж зберігання та проходження шлункового бар'єра [11].

Щоб захистити пробіотики від кислого середовища шлунку, на таблетковані й капсульовані форми наносять ацидорезистентні покриття або здійснюють іммобілізацію бактерій на сорбенті. Останніми роками розробляють нові форми препаратів пробіотиків – супозиторії, які мають істотні переваги. Так, вони потрапляють у місця, де потрібно нормалізувати мікробіоту, запобігаючи згубній дії кислого середовища шлунка. Крім того, така форма препаратів зручна для маленьких дітей [59].

Капсули. Важлива технологічна перевага капсул порівняно з іншими твердими формами лікарських засобів полягає у тому, що у цьому разі субстанція не зазнає вологої грануляції, теплового впливу та механічного тиску. Оскільки субстанцію пробіотика зазвичай отримують сублімаційним сушінням, що є стресовим фактором для мікроорганізмів, який значно знижує їхню активність та чисельність, бажано на наступних технологічних стадіях унеможливити подальший негативний вплив на бактерії зовнішніх факторів.

Капсулювання дає змогу захистити гігроскопічну та відносно нестабільну суху клітинну біомасу від вологи та кисню повітря, забезпечуючи тривале зберігання її специфічної активності та вихідних фізичних параметрів. Капсули також захищають клітини від бактерицидної

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
						50
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		

дії шлункового соку. Отримати ацидорезистентні капсули можна нанесенням на їхню поверхню спеціальної полімерної плівки. Препарат з модифікованим вивільненням дає можливість підвищити терапевтичну ефективність та скоротити тривалість лікувального курсу, що актуально для вітчизняних пробіотиків [39, 58].

Супозиторна форма зручніша порівняно з розчинами чи мазями у разі ректального та вагінального введення [3, 39, 58].

Останнім часом активно розробляють методи приготування двошарових супозиторіїв, які складаються з оболонки і стрижня. Завдяки цьому можна використовувати допоміжні речовини з різною температурою плавлення, а також поєднувати лікарські речовини з різними властивостями.

Через низьку ефективність супозиторіїв з послаблювальною дією, а також подразливою дією гліцерину на слизову оболонку прямої кишки проводять дослідження з розроблення шипучих супозиторіїв методом пресування. Як газотвірні компоненти використовують глюконат кальцію, лактат кальцію, лактат заліза, гідрокарбонат натрію, аскорбінову кислоту, екстракт ревеню та ін. Такі супозиторії виготовляють і контролюють їхню якість подібно до таблеток.

Супозиторна основа препарату має характеризуватися такими властивостями: стійкістю до світла, вологи, повітря та мікроорганізмів; має добре змішуватися з лікарською речовиною; не повинна проявляти подразливої та сенсibiliзувальної дії. Основам мають бути властиві відповідні реологічні показники: пластичність; оптимальна температура плавлення; необхідна твердість. Це дасть змогу ввести супозиторій у порожнину. Супозиторна основа може бути гідрофільною або ліпофільною [58].

Для *гідрофільної основи* характерною є невисока механічна пружність та міцність виготовлених з неї супозиторіїв, складність зберігання, оскільки при цьому підвищується температура розчинення супозиторіїв. Крім того, желатина є білковим продуктом, який легко зазнає мікробного псування, не

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		51

сумісний з дубильними речовинами, кислотами, лугами та іншими речовинами, здатними реагувати з білками; утворює нерозчинні продукти з солями важких металів [45, 58].

Як *ліпофільні основи* для виготовлення супозиторіїв використовують масло какао, суміш масла какао з парафіном та гідрогенізованими жирами, рослинні та тваринні гідрогенізовані жири, твердий жир, ланолін, суміші гідрогенізованих жирів з воском, твердим парафіном та інші основи, дозволені до медичного застосування. Ліпофільна основа супозиторія повинна швидко розчинятися у прямій кишці, мати достатню твердість і невеликий інтервал між температурою плавлення та застигання, достатню в'язкість, бути стабільною під час зберігання [58].

Зазначають, що кінцевий терапевтичний ефект пробіотика значною мірою залежить від форми його виготовлення. На жаль, форма виготовлення пробіотика у більшості випадків переслідує реалізацію комерційних інтересів виробника, ніж терапевтичних властивостей препарату. Наприклад, перевага ліофілізованих форм пробіотиків обумовлена прагненням до збільшення їх терміну зберігання, що негативно позначається на активності пробіотичної флори [73].

Попри те, що ліофілізація є одним з найбільш щадних методів консервації клітин мікроорганізмів, вона не може забезпечити повне збереження життєздатності й активності пробіотика. Крім того, при ліофілізації біомаса пробіотичних клітин з'єднується з протективними речовинами, які при деяких формах патології визначають протипоказання препарату. Ліофілізований пробіотик знаходиться в стані анабіозу, і для відновлення життєдіяльності клітин необхідно досить тривалий час реактивації – не менше 8 годин в ідеальних умовах, які, природно, відсутні в шлунково-кишковому тракті людини. Такі пробіотики абсолютно даремні для пацієнтів із синдромом діареї, а також маленьких дітей, у яких транзит їжі по травному каналу проходить значно інтенсивніше, ніж у дорослих людей. За час між дефекацією ліофілізований пробіотик не встигає вийти із

стану анабіозу і елімінується з організму, не виконавши своєї пробіотичної місії [73].

Важливу роль відіграють бактеріальні метаболіти, що містяться в пробіотиках, проте технології ліофілізованих пробіотиків не дозволяють збагатити препарат необхідною кількістю продуктів мікробного метаболізму.

Форма пробіотика вказує на передбачувану доставку мікроорганізмів у певну зону організму. Очевидно, що ліофілізовані пероральні пробіотики не зможуть проявити активність у ротовій порожнині, шлунку і проксимальних відділах кишечника, оскільки не встигнуть реактивуватись. Для цих цілей придатні тільки рідкі форми пробіотиків, в яких мікробіота спочатку знаходиться в активному стані й не вимагає тривалого часу для реактивації [88].

У зв'язку з тим, що більшість мікроорганізмів різко втрачають свою активність у шлунку через високу бактерицидність шлункового соку, при виготовленні багатьох пробіотиків бактеріальну біомасу пакують у кислотійкі капсули. Проте кислотійкі капсули не є надійною гарантією збереження активності пробіотика. Маючи стійкість до кислоти, вони миттєво розчиняються в лужних умовах 12-палої кишки, середовище якої не менш агресивне для мікробіоти, ніж середовище порожнини шлунку. Потужними інгібірувальними чинниками є також жовч, феноли, протеолітичні ферменти, що містяться в проксимальних відділах кишечника. Це призводить до масової загибелі пробіотичної флори ще задовго до її реактивації з ліофілізованого стану [73].

Необхідно враховувати, що капсульовані форми пробіотиків призначені для дітей старшого віку і дорослих пацієнтів, але не для дітей раннього віку. Шлунковий сік дітей раннього віку відрізняється низькою кислотністю, а капсулу маленька дитина проковтнути не може. Рекомендації щодо використання пробіотиків в капсулах у лікуванні дітей після їх розкриття і розведення вмісту в рідині є більш ніж не коректними. Багато пробіотиків у капсульованих формах містять штами, що відносяться до

					<i>КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3</i>	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		53

умовно-патогенних видів (найчастіше, ентерококи і ешерихії), що ставить під сумнів твердження про їх “абсолютну безпеку” для організму дитини і підтверджує неможливість використання таких пробіотиків у педіатрії. Тому поширення ліофілізованих пробіотиків і синбіотиків, упакованих у кислотостійкі капсули, навряд чи можна розглядати в якості ідеальної формули сучасного засобу бактеріальної терапії [42, 73].

Резистентність до шлункового соку, жовчі, фенолу, панкреатичних ферментів, лізоциму та інших природних інгібіторів травного тракту безперечно є важливою властивістю пробіотиків. Тільки за наявності стійкості до шлунково-кишкових інгібіторів мікробіота пробіотика має шанси в життєдіяльному стані досягати товстої кишки і проявляти в ній функціональну активність. При обґрунтуванні концентрації життєздатної мікробіоти в пробіотику обов’язково повинна враховуватися ступінь виживання.

Слід враховувати, що важливим захисним чинником відносно мікробіоти є їжа. Тому поширені рекомендації щодо використання пробіотиків натщесерце є не обґрунтованими. Прийом препаратів під час або відразу ж після їжі є раціональнішим, оскільки дозволяє значно підвищити ступінь виживання мікробіоти в шлунку і 12-палій кишці [66].

Пробіотики слід виробляти відповідно до правил належної виробничої практики — Good manufacturing practice (GMP) [58].

Підготовка посівного матеріалу та виробничий біосинтез.

У процесі виробництва пробіотиків, як й інших продуктів мікробного синтезу, критичним фактором є можлива мінливість виробничих штамів мікроорганізмів унаслідок багаторазових пересівів. З урахуванням цього під час зберігання музейних і робочих культур мікроорганізмів потрібно постійно контролювати стабільність штамів та їхню фізіологічну активність.

Підготовка інокуляту у виробництві пробіотиків передбачає кілька етапів, першим з яких є одержання робочої культури мікроорганізму з музейної. Далі здійснюють кілька послідовних пересівів робочої культури на

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
						54
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		

рідких поживних середовищах. Іноді для вирощування посівного матеріалу використовують різні поживні середовища. У деяких випадках підготовка інокуляту може охоплювати до шести стадій (генерацій культури).

Виробничий біосинтез здійснюють в умовах глибинного періодичного культивування в реакторах, установлених у боксах. Реактори зазвичай оснащують мішалкою й паровою оболонкою. Основними факторами, що обмежують розвиток мікроорганізмів за таких умов, є вичерпання компонентів поживного середовища та накопичення токсичних продуктів метаболізму. Цьому можна запобігти, здійснюючи дробну подачу субстрату або використовуючи діалізні камери для вилучення небажаних метаболітів. Перспективним також є безперервне культивування. Проте нині такий спосіб культивування широко не застосовують у виробництві пробіотиків. Упродовж виробничого біосинтезу періодично відбирають проби культуральної рідини для визначення кількості живих клітин (КУО/см³).

Стабілізація культуральної рідини.

За відсутності захисних речовин бактеріальні клітини зазнають значних змін, що може супроводжуватися руйнуванням клітинних структур і втратою життєздатності.

У промисловості найчастіше застосовують комбіновані захисні середовища, що містять сахарозу, лактозу, цитрат, глютамат натрію, знежирене молоко, сироватку з додаванням різних вуглеводів, багатоатомних спиртів та солей.

Розлив напівфабрикату.

Стабілізовану захисним середовищем культуральну рідину розливають на апаратах розливу. Розлитий напівфабрикат надходить на наступну стадію.

Сублімаційне сушіння.

Напівфабрикат заморожують за температури -40 °С. За цієї температури його витримують упродовж 18 – 24 год, після чого сублімаційно сушать. У разі розливу напівфабрикату в ампули їх розміщують у морозильних камерах під кутом 75°, флакони – вертикально.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		55

Промислові штами молочнокислих бактерій істотно відрізняються за ступенем виживання під час сублімації. Зокрема, менш вразливими є кокові форми, тоді як термофільні лактобацили, навпаки, найчутливіші. Ці закономірності слід урахувати, вибираючи технологічні режими. Виживання мікроорганізмів і збереження початкового рівня активності залежать насамперед від градієнта температури під час сублімації, складу захисного середовища, співвідношення між концентрацією біомаси і захисних речовин.

Закупорювання. Ампули із сухою мікробною масою запаюють (флакони закупорюють) під вакуумом або в потоці інертного газу.

Контроль якості готового препарату.

Під час контролю готових пробіотиків визначають кількість життєздатних клітин у дозі або ваговій одиниці препарату, яка має відповідати вимогам аналітичної нормативної документації на конкретний препарат. Пробіотики не повинні містити сторонньої мікробіоти, допускається незначна кількість непатогенних мікроорганізмів [39].

Нешкідливість пробіотиків контролюють біопробою на лабораторних тваринах, яким вводять препарат перорально. Залишкова вологість ліофільно висушених препаратів не повинна перевищувати 3 – 5%, а сорбційних – 7 – 8%.

У деяких випадках нормативна документація передбачає визначення антагоністичної активності готового пробіотика щодо патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів [11, 59].

2.5 Склад та якість поживних середовищ для культивування біфідобактерій.

Актуально розширення виробництва препаратів і харчових продуктів пробіотичної дії, призначених для корекції мікробіоти шлунково-кишкового тракту, за допомогою промислових штамів мікроорганізмів [19].

Завжди при створенні нових технологій спочатку слід провести розрахунок параметрів середовища, конструкції реактора і режиму його

					<i>КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3</i>	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		56

роботи, тобто дотримуватися наукової обґрунтованості біотехнологічних процесів [71].

Джерела сировини для біосинтезу мікроорганізмів.

Серед безлічі компонентів поживного середовища основним вважається той, який служить мікроорганізмам джерелом вуглецю та енергії. Такі компоненти називають субстратом, а всі інші - допоміжними речовинами. Особливу значимість мають субстрати для біосинтезу мікробного білка.

Поживними середовищами називають суміші речовин, на яких вирощують мікроорганізми в лабораторних і промислових умовах. Склад поживного середовища і його фізико-хімічні характеристики повинні відповідати фізіологічним потребам вирощуваної культури мікроорганізмів [58, 59].

Характеристика компонентів поживних середовищ.

Найбільше біогенне значення для будь-якого живого організму має вуглець. Він входить до складу всіх органічних молекул, що утворюються в клітині, і на його частку припадає в середньому 50% клітинної речовини. З цієї причини джерела вуглецю займають основне місце серед компонентів поживних середовищ [67].

У мікробіологічній промисловості широко використовуються чисті вуглеводи, а також природні і технічні продукти, багаті вуглеводами. До них відносяться глюкоза, сахароза, лактоза, крохмаль, кукурудзяна мука, меляса, зелена патока.

Азотне живлення мікроорганізмів за своїм значенням наближається до вуглецевого, хоча поступається за обсягом. Азот входить до складу клітинних компонентів, які забезпечують життєздатність організмів. Джерелами азотного живлення для продуцентів біологічно активних речовин служать різні азотовмісні речовини неорганічного й органічного походження. Джерелами мінерального азоту найчастіше є солі амонію та азотної кислоти.

В якості органічних джерел азоту в промисловості найбільш широко застосовуються кукурудзяний екстракт та соєве борошно [71].

Технічна глюкоза містить не менше 99,5% редукуючих речовин (в перерахунку на сухий залишок) і фактично являє собою чистий вуглевод.

Сахароза – буряковий чи тростинний цукор. Технічна сахароза, що використовується в промисловості, містить не менше 99,75% сахарози, яка являє собою дисахарид, що складається з глюкози і фруктози [3].

Крохмаль на 96 – 97% складається з полісахаридів, крім того, в ньому присутні мінеральні речовини і жирні кислоти. Полісахариди крохмалю представлені двома типами – амілозою (10 – 20%) і амілопектином (80 – 90%).

Амілоза та амілопектин відрізняються за своєю хімічною будовою. У молекулі амілози окремі залишки глюкози зв'язані між собою у вигляді нерозгалуженої нитки. Молекулярна маса амілози коливається від 3×10^5 до 1×10^6 . Якщо амілоза представляє собою лінійний полімер, то молекула амілопектину є дуже розгалуженою. Молекулярна маса амілопектину сягає сотень мільйонів [45, 71].

Кукурудзяне борошно отримують при розмелюванні зерен кукурудзи. У промислових середовищах кукурудзяна мука часто замінює крохмаль, будучи більш дешевою сировиною.

Кукурудзяне борошно містить: крохмаль – 67 – 70%; інші вуглеводи (клітковина, пентозани, розчинні вуглеводи) – 10%; білки – 12%; зола – 0,9%.

Серед зольних елементів в найбільшій кількості присутні іони фосфору, калію, магнію. Склад кукурудзяного борошна може коліватися в значних межах залежно від сорту кукурудзи, умов її вирощування та зберігання.

Кукурудзяний екстракт – це відходи виробництва крохмалю з кукурудзи. За зовнішнім виглядом це густа рідина темно-коричневого кольору у вигляді пластівчастої суспензії або майже однорідна [71].

Основними елементами золи є фосфор, калій, магній. Кукурудзяний екстракт також містить вітаміни групи В, деякі ростові речовини, біостимулятори, є джерелом харчових волокон і фруктоолігосахарідів, тому стимулює ріст нормальної мікробіоти, крім того є менш коштовним, ніж сировина тваринного походження.

Соеве борошно отримують при розмелюванні соєвих бобів, а також соєвої макухи і шроту, що утворюються після вилучення соєвої олії. Соеве борошно підрозділяється на незнежирене, полужнежирене і знежирене. Крім того, соєве борошно буває дезодорованим (оброблене паром) і недезодорованим. Обробка паром дозволяє збільшити термін зберігання, і дезодороване борошно може зберігатися протягом року, а не дезодороване – 1,5 – 3 місяці.

Окрім високоякісного білку соя містить велику кількість різноманітних біологічно-активних речовин функціонального призначення таких як: поліненасичені жирні кислоти, вітаміни, макро- і мікроелементи, харчові волокна, олігосахариди і не містить холестерину та твердих жирів [18, 19].

Соеве молоко є багатим джерелом водорозчинних вітамінів (тіамін, рибофлавін, ніацин, фолієва кислота, токофероли); вітамін К; а так само багате на фосфор, заліз, цинк. Продукти переробки сої містять такі пребіотичні олігосахариди, як стахіозу і рафінозу.

З основних компонентів соєвого борошна особливе значення для процесів ферментації мають азотовмісні речовини. Азот соєвого борошна знаходиться головним чином у складі білків, на частку яких припадає 40,5%. Крім білків в соєвому борошні містяться вуглеводи – до 25%; органічні кислоти – 1,5%; зола – 4,5 – 6,5%.

У незнежиреному борошні міститься 19,5% жиру. До складу золи входять іони калію, фосфору, магнію, кальцію, а також ряд мікроелементів [71].

Мінеральні елементи в клітинах мікроорганізмів необхідні для регулювання осмотичного тиску, окисно-відновних умов і величини рН.

Одна з основних функцій мінеральних елементів – участь у ферментативному каталізі. В даний час дія четвертої частини всіх ферментів у клітині пов'язана з металами. Мінеральний склад поживного середовища формує розподіл електричних зарядів на поверхні клітини. Зазвичай клітини мікроорганізмів мають негативний заряд. При додаванні в середовище електролітів він знижується і тим сильніше, чим вище валентність протиіона, що додається. Зміна електричного потенціалу клітин може змінити їх фізіологічну діяльність, впливати на селективність клітинної мембрани, викликати флокуляцію або флотацію клітин [53, 64].

Мінеральний склад в мг/100г сухої речовини: калію – 1197,5; кальцію – 115,0; магнію – 475,8; феруму – 17,8; загального фосфору (нефітінового – 139,9; фітінового – 854,4, що становить 85,9%); Са:Мg – 0,242.

Для вирощування мікроорганізмів також використовують гідролізати *деревних відходів і солод*.

Промислові поживні середовища підрозділяють на посівні та основні ферментаційні. Перші призначені для приготування посівного матеріалу, другі для виробництва продукції [39, 71].

Середовища повинні містити окремі інгредієнти в певних співвідношеннях, пропорційних потребам в них даної культури мікроорганізмів. Специфічність поживних середовищ визначається набором сполук, що поставляють клітинам вуглець і азот. У багатьох випадках сполуки, необхідні для існування одних мікроорганізмів, виявляються абсолютно непридатними для інших, і тому не може бути універсального поживного середовища для всіх мікроорганізмів. Менш різноманітні організми за потребами в мінеральних речовинах, тому мінеральний фон середовищ для багатьох мікроорганізмів буває дуже близьким за складом.

Мікробіологічна практика свідчить, що ефективні середовища для культивування виробничих штамів бактерій можуть бути приготовлені із застосуванням поживних основ з досить широкого кола взаємозамінних субстратів тваринного, рослинного або іншого походження. Поживну основу,

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		60

що містить необхідні нутрієнти для метаболізму різних мікроорганізмів, можна використовувати як універсальний базовий компонент при конструюванні поживних середовищ різного призначення. При цьому з'являється можливість розробки уніфікованих комплексів поживних середовищ для виробничого застосування [45, 59].

Поживне середовище як складова уніфікованого комплексу повинне складатися з двох частин: постійної (універсальної), що включає базовий субстрат, а також змінної (специфічної), що залежить від потреб конкретного виробничого штаму бактерій. Приготування такого середовища може включати окрему підготовку обох частин, а їх змішування можна здійснювати безпосередньо перед або в ході культивування мікроорганізмів [45].

Алгоритм конструювання уніфікованих комплексів поживних середовищ для промислового виробництва пробіотиків включає кілька необхідних етапів:

- попередній вибір поживних субстратів з урахуванням критеріїв біологічної цінності, доступності й економічності;
- отримання поживних основ та оцінка їх ефективності на моделі регламентованих поживних середовищ;
- розробка й оцінка способів отримання поживних основ з урахуванням критеріїв технологічності і трудомісткості;
- балансування складу поживних середовищ [72, 82, 96].

2.6 Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва

Гарантією високої якості препаратів, що містять пробіотики, є технологія їх виробництва, відповідна до вимог, запропонованих до виробництва біотехнологічних продуктів [9, 55].

Технологія одержання препарату *V. bifidum* сухого

Виробництво препаратів пробіотиків, у тому числі *V. bifidum* сухого, складається з наступних операцій:

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		61

1. Підготовка виробничих приміщень, персоналу, устаткування, реманенту й первинного впакування.

2. Одержання поживних середовищ, розчинів, кріопротекторів.

Для культивування біфідобактерій, як і для вирощування інших штамів пробіотиків, використовуються різні поживні середовища, до конструювання яких висувають наступні вимоги:

- попередній вибір поживних субстратів з обліком критеріїв біологічної цінності, доступності й економічності;

- балансування поживних середовищ;

- одержання поживних основ і оцінка їх ефективності на моделі регламентованих поживних середовищ;

- розробка й оцінка способів одержання поживних основ з урахуванням критерію технологічності й трудомісткості.

Для культивування біфідобактерій використовують середовище Біфідум. До його складу входять(г/дм³): панкреатичний гідролізат казеїну – 30,0; екстракт пекарських дріжджів – 5,0; глюкоза – 2,5; лактоза – 7,5; цистеїн – 0,5; NaCl – 0,5; MgSO₄ – 2,5; аскорбінова кислота – 0,5; ацетат натрію – 0,3; лимоннокислий амоній – 0,3; агар – 0,75; вода – до 1,0 дм³; встановлюють рН таким чином, щоб після стерилізації значення рН становило (6,8 ± 0,3); кип'ятять, фільтрують і стерилізують при 112 °С 30 хвилин при тиску 0,05 МПа. Середовище зберігають при температурі 6±2 °С не більш 2-х місяців [58, 59].

3. Одержання інокулята біфідобактерій.

Інокулят отримують у результаті двох послідовних пересівів робочої культури біфідобактерій на середовищі Біфідум. Використовують флакони (ампули) з ліофілізованою робочою культурою біфідобактерій *B. bifidum* (10⁸ – 10⁹ КУО/см³), у які вносять фізіологічний розчин хлориду натрію (1 см³ на дозу), ретельно перемішують і переносять у колби з поживним середовищем Біфідум. Культуру біфідобактерій вирощують у термостаті за температури 38±1 °С упродовж 70 – 72 год.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		62

Мікробіологічний контроль цієї культури здійснюють мікроскопіюванням, а також висівом на МПА з 5 % глюкози і агаризоване середовище Сабуро (для виявлення сторонньої бактеріальної і грибної мікробіоти відповідно). Посіви на МПА витримують у термостаті за температури 38 ± 1 °С упродовж 48 год, на середовищі Сабуро – за 22 ± 1 °С протягом 72 год. Якщо сторонньої мікробіоти немає, то цю культуру використовують як посівний матеріал для одержання культури I генерації, збільшуючи об'єм середовища Біфідум у десять разів.

Через 40 – 48 год знову виконують мікробіологічний контроль, а також визначають кількість живих клітин за методом Коха на рідкому середовищі Біфідум (має бути не нижче ніж 10^9 КУО/см³).

По закінченню контролю маточну культуру використовують для виробничого посіву й одержання рідкого напівфабрикату біфідобактерій. Повторюють культивування, збільшуючи об'єм модифікованого середовища у десять разів для одержання культури II генерації. Через 40 – 48 год знову виконують мікробіологічний контроль, а також визначають кількість живих клітин за методом Коха (має бути не нижче ніж 10^9 КУО/см³).

4. Одержання рідкого напівфабрикату біфідобактерій.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері BIOSTAT D-DCU на середовищі Біфідум за таких параметрів культивування: температура 38 ± 1 °С; рН 6,8 – 7,3 (регулюють 5%-м розчином аміаку); надлишковий тиск 0,03 – 0,04 МПа; тривалість 10 – 14 год. Процес вирощування біфідобактерій у ферментері відбувається під тиском азоту. У процесі біосинтезу перемішувальний пристрій (70 об/хв) вмикають на кілька (2 – 3) хвилин тільки перед відбором проб та після подачі 5%-го розчину аміаку.

Через кожні 2 год культивування з ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю і визначення концентрації живих клітин. Процес культивування зупиняють після досягнення концентрації біфідобактерій на рівні 10^9 КУО/см³.

5. Стабілізація культуральної рідини.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		63

До культуральної рідини, одержаної на попередній стадії, додають захисне сахарозо-молочне середовище та розчин желатину і встановлюють рН 6,0 – 6,5 5%-м розчином аміаку, одержуючи напівфабрикат біфідобактерій *B. bifidum*. На цій стадії обов'язково здійснюють мікробіологічний контроль напівфабрикату на відсутність сторонньої мікробіоти. У контрольній пробі після додавання середовища висушування визначають:

- стерильність - відсутність сторонньої мікробіоти (бактерій і грибів);
- кількість живих біфідобактерій - в одній дозі препарату повинне міститися не менш 10^7 КУО/см³ живих бактерій;
- активність кислотоутворення - одна доза препарату біфідобактерій повинна утворювати кислоту не нижче 90 °Т;
- мікроскопічне дослідження - у мазках пофарбованих за Грамом повинні бути типові грампозитивні поліморфні палички з біфуркаціями на одному або двох кінцях, довжиною 4-5 мкм.

Для приготування сахарозо-молочного середовища знежирене молоко фільтрують для видалення механічних краплень, доводять рН до 7,4 – 7,6 (розчином аміаку), стерилізують за температури 121 °С упродовж 45 хв, охолоджують до 35 – 40 °С, додають сахарозу до кінцевої концентрації 30 – 32%, після чого знову стерилізують. Стерильність сахарозо-молочного середовища перевіряють висівом на МПА і середовище Сабуру.

Щоб отримати розчин желатину до сухого желатину додають дистильовану воду з розрахунку 1 дм³ води на 90 – 100 г желатину. Розчин ретельно перемішують і залишають для набухання за кімнатної температури на 3 год, після чого підігривають на водяній бані (50 – 60 °С) до повного розчинення желатину і стерилізують.

б. Розлив напівфабрикату біфідобактерій B. bifidum у флакони.

Для підготовки первинного пакування препарату можна використовувати флаконну лінію ВХКЗ фірми Lухан. Лінія автоматично виконує подачу флаконів, заповнення їх водою, ультразвукове миття,

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		64

захоплення і перевертання флаконів, зрошування водою та обдування всередині й зовні флаконів, підігрівання, сушіння, стерилізацію та охолодження флаконів. Під час миття застосовують комбіновану технологію очищення флаконів, що передбачає ультразвукове миття, зрошування водою й обдування флаконів повітрям високого тиску.

Операції з наповнення флаконів напівфабрикатом біфідобактерій *B. bifidum* здійснюють на розливній машині KGS, що входить до складу флаконної лінії ВХКЗ. Машину для розливу KGS лінійного типу оснащено V-подібними фіксаторами для орієнтації флаконів, тому розлив напівфабрикату *B. bifidum* відбувається синхронно під час руху флаконів. Машина KGS забезпечує пряме регулювання дози препарату на панелі керування, а рецептури дозування препаратів зберігаються у пам'яті мікропроцесора і можуть використовуватися повторно. Напівфабрикат біфідобактерій *B. bifidum* розливають по 5 або 10 доз у флакони, вибірково контролюючи його на наявність сторонньої мікробіоти, і передають на наступну стадію.

7. Сублімаційне сушіння напівфабрикату біфідобактерій *B. bifidum*.

Цей етап складається з двох стадій: заморожування і сублімаційного сушіння. Напівфабрикат біфідобактерій *B. bifidum* заморожують за температури $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ упродовж 18 – 24 год (залежно від завантаження апарата). Сублімаційне сушіння замороженого препарату здійснюють під вакуумом (26,6 Па). Через 40 год після початку процесу сушіння починають плавне підігрівання полиць сублімаційної установки на $1 - 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ за годину до досягнення температури $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, після чого збільшують підігрівання на $2 - 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ за годину до досягнення температури $32 - 34\text{ }^{\circ}\text{C}$. За цієї температури напівфабрикат біфідобактерій *B. bifidum* витримують приблизно 6 год. Процес сушіння триває близько 80 год. Після цього флакони накривають гумовими пробками та передають на стадію закупорювання.

8. Маркування й пакування, контроль якості готового препарату.

Випробування ліофілізованого препарату проводять за наступними тестами:

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
						65
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		

1. Опис – кристалічна або пориста маса різних відтінків бежевого або біло-сірого кольору.

2. Розчинність – при розчиненні в 0,9% розчині натрію хлориду з розрахунку 1 см³ на одну дозу препарат повинен розчинитися протягом 5 хв з утворенням непрозорої гомогенної суспензії.

3. рН – 6,0±0,5.

4. Втрата в масі при висушуванні – не більш 3,5%.

5. Мікробіологічна чистота – при мікроскопії мазків, пофарбованих за Грамом повинні виявлятися грампозитивні поліморфні палички з біфуркацією на одному або двох кінцях. При посіві на середовищах не повинен виявлятися ріст грибів і бактерій.

6. Аномальна токсичність – контроль проводять пероральним введенням білим мишам 1 дози препарату.

7. Кількість живих біфідобактерій в одній дозі - в одній дозі препарату не менш 10⁹ КУО/см³ живих біфідобактерій.

8. Активність кислотоутворення бактерій – не менш 90 °Т.

					<i>КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3</i>	Аркуш
<i>Зм</i>	<i>Аркуш</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		66

РОЗДІЛ 3

ОПИС ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТУ *Bifidobacterium bifidum*

3.1 Характеристика складу традиційних відомих поживних середовищ для культивування біфідобактерій

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

B. bifidum вирощують на [58]:

- середовищі Блаурокка, г/дм³: пептон – 10,0; лактоза – 10,0; цистеїн – 0,1; NaCl – 5,0; агар – 1,5; рідкі компоненти: печінковий настій – 100,0 см³/дм³; вода – до 1,0 дм³; рН 7,0 – 7,2.

- середовищі Біфідум, г/дм³: панкреатичний гідролізат казеїну – 30,0; екстракт пекарських дріжджів – 5,0; глюкоза – 2,5; лактоза – 7,5; цистеїн – 0,5; NaCl – 0,5; MgSO₄ – 2,5; аскорбінова кислота – 0,5; ацетат натрію – 0,3; лимоннокислий амоній – 0,3; агар – 0,75; вода – до 1,0 дм³; рН 6,8 – 7,3.

- кукурудзяно-лактозному середовищі (КЛС), г/дм³: пептон – 10,0; глюкоза – 5,0; лактоза – 5,0; цистеїн – 0,2; MgSO₄ – 2,0; лимоннокислий натрій – 8,0; NaH₂PO₄ – 2,0; K₂HPO₄ – 1,0; агар – 1,5; рідкі компоненти: кукурудзяний екстракт – 15,0 см³/дм³; вода – до 1,0 дм³; рН 7,4 – 7,5.

- модифікованому середовищі МРС, г/дм³: пептон – 10,0; глюкоза – 20,0; MgSO₄ – 0,2; ацетат натрію – 5,0; лимоннокислий амоній – 2,0; MnSO₄ – 0,05; K₂HPO₄ – 2,0; агар – 1,5; рідкі компоненти, см³/дм³: м'ясна вода – 100,0; дріжджовий автолізат – 50,0; печінковий екстракт – 100,0; твін-80 – 1,0; вода – до 1,0 дм³; рН 6,4 – 6,8.

- казеїново-дріжджовому середовищі (КДС), г/дм³: NaCl – 5,0; агар мікробіологічний – 0,5; лактоза – 10,0; L- цистеїн – 0,1; дріжджовий автолізат

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		67

– 650,0 см³/дм³; гідролізат казеїну – 350,0 см³/дм³; печінковий екстракт – 100,0 см³/дм³; вода очищена – до 1,0 дм³; рН середовища 7,4 – 7,5.

3.2 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Зарядження ферментерів полягає в приготуванні у них живильного середовища (останній етап її приготування), яка потім засівається виробничою культурою біфідобактерій із посівних ферментерів. Живильне середовище у ферментері готують у такій послідовності: спочатку набирають у ферментер стерильну охолоджену воду, уводять стерильні розчини компонентів середовища із варочного агрегату підготовчого відділення, після чого додаванням стерильної води (із перемішуванням) об'єм розчину доводять до температури - 38±2°C.

Потім із посівного ферментера (коли працює мішалка) культура біфідобактерій за допомогою стиснутого стерильного повітря направляється по стерильному трубопроводу в основний ферментер. Уміст основного ферментера ретельно перемішують протягом 30 хв і відбирають пробу для визначення рН, концентрації і мікробіологічної чистоти

3.3 Культивування біфідобактерій на традиційних та модифікованому поживному середовищі

Враховуючи певні відмінності біологічних властивостей біфідобактерій, ізольованих з різних природних джерел, та рекомендації використання регіональних штамів бактерій [46] культуру біфідобактерій — *Bifidobacterium bifidum* брали з колекції мікробних культур кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування. З метою оцінки кількості біфідобактерій у зразках використовували класичне напіврідке поживне середовище (кукурудзяно–лактозне середовище) та тіогліколеве середовище з додаванням різної масової частки соєвої сироватки та продуктів біокаталізу рослинних полісахаридів яблучних вичавок.

Для культивування біфідобактерій найбільш відомими середовищами є: середовище MRS, середовище Блаурокка, тіогліколеве середовище, кукурудзяно-лактозне середовище (КЛС), середовище Біфідум, казеїново-

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		68

дріжджове середовище (КДС), гідролізоване молоко [19]. Проаналізовано склад для зростання біфідобактерій на перелічених видах поживних середовищ.

Змінювали традиційний склад поживних середовищ шляхом часткової заміни їх рецептур внесенням менш вартісних компонентів та олігосахаридів, зокрема соєвої сироватки та з пектиновмісної яблучної сировини. При цьому визначали вплив такої добавки в концентрації по 1 - 8% та досліджували кількісні та якісні характеристики зростання мікробної культури на модифікованих поживних середовищах. В якості контрольного брали кукурудзяно-лактозне середовище (КЛС).

Соєву сироватку після отримання тофу за наведеною технологією [19] додавали в кількості 1-8%. Для стимулювання росту біфідобактерій в запропонованих видах поживних середовищ використовували наданий розчин пектину після біоконверсії за розробленою в ОНАХТ технологією, який містить олігосахариди із пектиновмісної сировини – яблучних вичавок. Ці продукти біокаталізу рослинних полісахаридів є низькомолекулярними олігосахаридами з молекулярною масою 3,5 кДа [37]. Схема отримання цього яблучного інгредієнта наведена на рисунку 3.1.

Вказані олігосахариди додавали у поживне середовище в кількості 1 - 8% для визначення їх впливу на ріст біфідобактерій. Необхідне значення рН 6,8–7,3 розчину створювали за допомогою 5% NH_3 .

За відомими аналітичними джерелами наведено характеристику складу наявних поживних середовищ та запропонований склад модифікованого середовища для культивування біфідобактерій, який також наведений в табл. 3.1.

					<i>КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3</i>	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		69

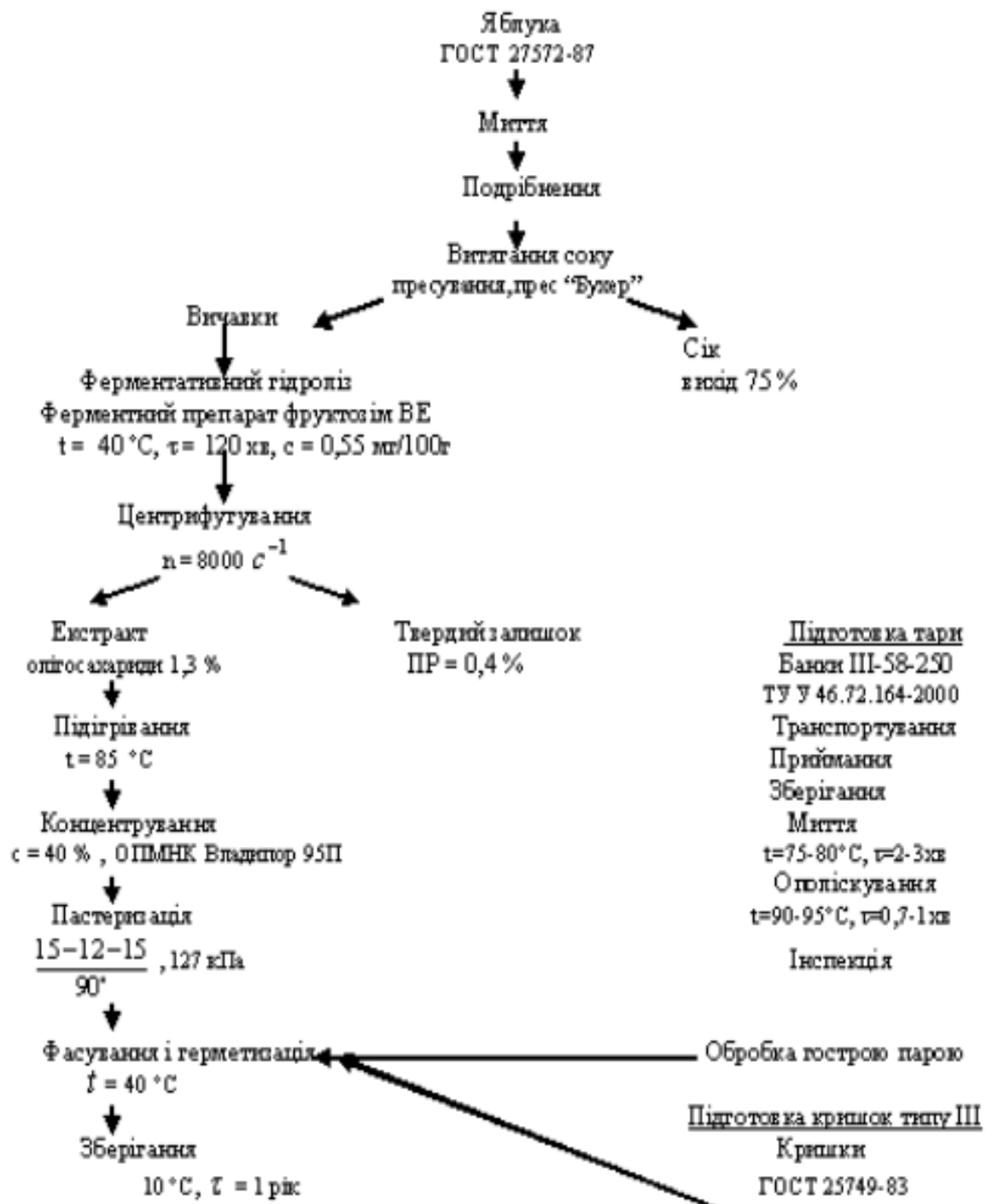


Рис. 3.1 Технологічна схема виробництва сиропу галактуранових олігосахаридів [37]

Таблиця 3.1

Склад поживних середовищ для культивування *Bifidobacterium bifidum*

Перелік інгредієнтів	Складові поживних середовищ, г/дм ³ (см ³ /дм ³)						
	середовище Блаурокка	тіогліколевое середовище	середовище Біфідум	кукурудзяно-лактозне середовище (КЛС)	модифіковане середовище MPC (MRS)	казеїнове дріжджове середовище (КДС)	Запропоноване середовище
панкреатичний гідролізат казеїну	–		30,0	–	–	350,0	–
пептон	10,0	15,0	–	10,0	10,0	–	8,0
лактоза	10,0		7,5	5,0	–	10,0	5,0
м'ясна вода	–		–	–	100,0	–	–
L-цистеїн	0,1	0,75	0,5	0,2	–	0,1	0,2
тіогліколят натрію	–	0,5	–	–			
екстракт пекарських дріжджів	–	5,0	5,0	–	–	–	–
дріжджовий автолізат	–		–	–	50,0	650,0	–
глюкоза	–	5,0	2,5	5,0	20,0	–	–
NaCl	5,0	2,5	0,5	–	–	5,0	–
агар	1,5	0,75	0,75	1,5	1,5	0,5	1,0
лимоннокислий амоній	–		0,3	–	2,0	–	–
ацетат натрію	–		0,3		5,0	–	–
MgSO ₄	–		2,5	2,0	0,2	–	2,0
аскорбінова кислота	–		0,5	–	–	–	–
лимоннокислий натрій	–		–	8,0	–	–	–
натрій вуглекислий	–	0,4	–	–	–	–	–
NaH ₂ PO ₄	–		–	2,0	–	–	2,0
K ₂ HPO ₄	–		–	1,0	2,0		1,0

Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата

КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3

Аркуш

71

Продовження табл.3.1.

кукурудзяний екстракт	–		–	15,0	–	–	–
соева сироватка	–		–	–	–	–	4-8
яблучні інгредієнти	–		–	–	–	–	4-8
печінковий настій (екстракт)	100,0		–	–	100,0	100,0	–
MnSO ₄	–		–	–	0,05	–	–
твін-80	–		–	–	1,0	–	–
вода	до 1,0 дм ³	до 1,0 дм ³	до 1,0 дм ³	до 1,0 дм ³	до 1,0 дм ³	до 1,0 дм ³	до 1,0 дм ³
pH	7,0 – 7,2		6,8 – 7,3	7,4– 7,5	6,4 – 6,8	7,4 – 7,5	6,8 – 7,3

Попередніми дослідями було визначено доцільність використання запропонованих рослинних інгредієнтів у співвідношенні 1:1, оскільки різні за хімічною природою їх складові здатні прискорювати зростання і потенціювати накопичення мікробних клітин.

Визначали які складові запропонованих рослинних компонентів поживного середовища здатні активувати зростання мікробної культури. По-перше соєва сироватка містить ряд водорозчинних вітамінів, необхідних для вимогливої до поживних середовищ культури *Bifidobacterium bifidum*. Це вітаміни групи B, зокрема тіамін, рибофлавін, ніацин, біотин, фолієва та пантотенова кислоти; холін в значних навіть в порівнянні з тваринними джерелами концентраціях; містить фосфоліпиди, поліненасичені жирні кислоти, ізофлавоноїди та інші сполуки, що важливо для біосинтезу мікробних клітин. Соеві олігосахариди є джерелами вуглеводних промоторів росту біфідобактерій, що відмічалось, зокрема в дисертації [41]. В зв'язку з більшою вимогливістю до складу поживного середовища, порівнюючи біфідобактерії з іншими молочнокислими мікроорганізмами, визначали комплекс потрібних для їх зростання речовин. Слід зазначити, що для росту

культури *Bifidobacterium bifidum* необхідні пептиди, олігосахариди, з амінокислот необхідними є лізин, пролін, цистеїн, серин, аланін, аспарагінова і глутамінова кислоти, аміноцукри, ненасичені жирні кислоти, пуринові та піримідинові основи. За переліченими амінокислотами соєва сироватка у 1,9 – 3,9 рази багатша за кукурудзяний екстракт і навіть інші бобові культури і містить у мг/100г: лізин (2090), пролін (1860), цистеїн (550), серин (2070), аланін (1470), аспарагінову (3820) і глутамінову (6050) кислоти.

Рослинні яблучні інгредієнти збагачують поживне середовище комплексом поліфенольних сполук, також доповнюють вітамінний комплекс, зокрема також аскорбіною кислотою, рядом органічних кислот – яблучною, лимонною, винною, оксикоричними кислотами тощо, комплексом мінеральних речовин: макроелементами – калієм, натрієм, фосфором, магнієм (що дало змогу відмовитися від додавання ряду солей у поживне середовище), рядом мікроелементів – залізом, купрумом, цинком, що важливо для будівництва ферментних систем мікробної клітини. Цими факторами можливо пояснити результати прискореної і більш активної біосинтетичної діяльності досліджуваної мікробної культури.

Як вже вказувалося, визначено доцільність додавання у поживне середовище соєвого та яблучного компонентів у співвідношенні 1:1. В табл. 3.2 наведені кількісні показники зростання мікробної культури на різних поживних середовищах.

Кількісні результати, які наведені в табл. 3.2, показали доцільність використання модифікованого соєвим та яблучним компонентами поживного середовища. Визначено доцільність додавання у поживне середовище по 6 % соєвого та яблучного компонентів у співвідношенні 1:1. Крім підвищеної біосинтетичної активності культури слід відмітити прискорене її накопичення в процесі культивування. Таким чином, раціональна концентрація запропонованих рослинних добавок становить по 6%.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		73

Порівняльна оцінка зростання *Bifidobacterium bifidum* на традиційних і запропонованих поживних середовищах

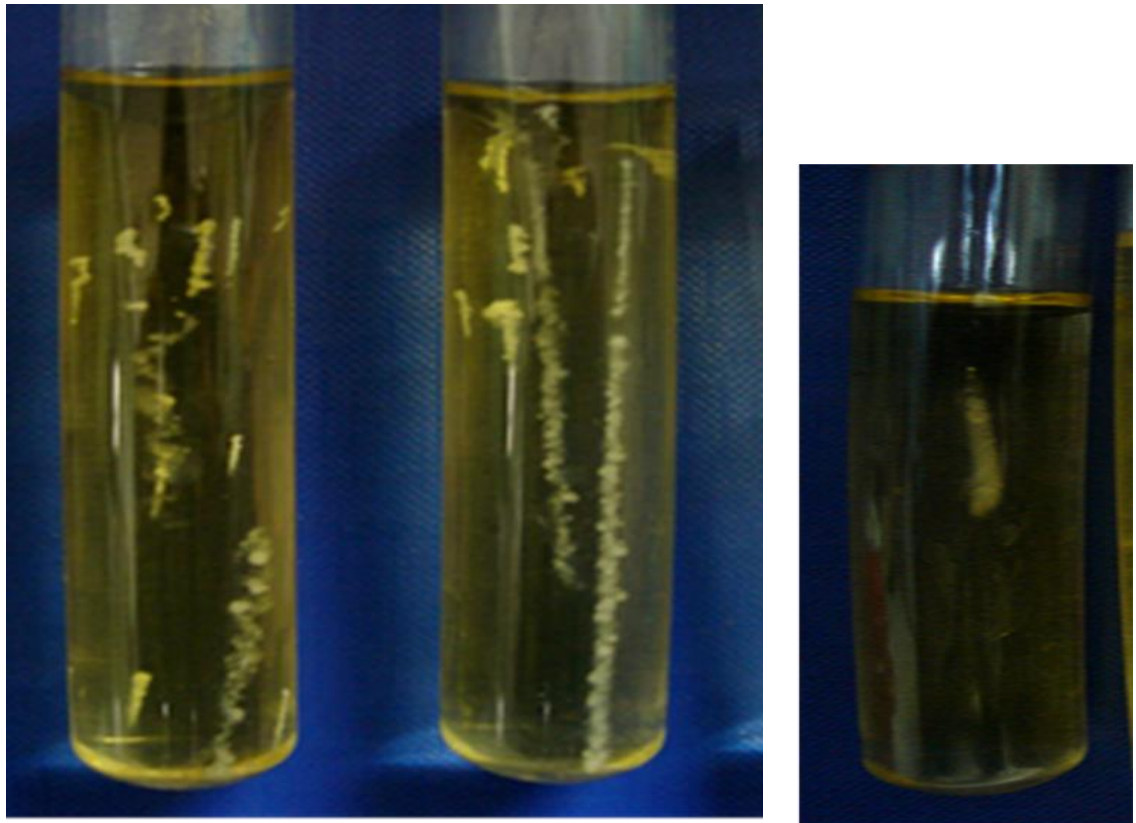
Час культивування, год	Кількість мікроорганізмів в процесі культивування, температура $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, Lg КУО/см ³ на поживних середовищах				
	запропоноване середовище з 4% рослинною добавкою	запропоноване середовище з 6% рослинною добавкою	запропоноване середовище з 8% рослинною добавкою	тіогліколеве середовище	кукурудзяно-лактозне середовище (КЛС)
3	6,2	6,4	6,3	5,9	6,1
6	7,0	7,1	7,0	6,8	6,9
9	8,5	8,7	8,5	8,1	8,4
12	9,9	10,9	11,0	9,1	9,2
24	11,3	11,6	11,2	10,8	10,8
30	11,3	11,6	11,1	10,6	10,8

Взагалі ідентифікацію мікроорганізмів проводять за комплексом показників, а саме визначають морфологічні, тинкторіальні, фізіологічні, антигенні, молекулярно-біологічні ознаки. За деякими з них, зокрема морфологічними та тинкторіальними (забарвленням) особливостями, культури, що виростили на запропонованому середовищі, ідентичні вихідній мікробній культурі. Зростання *Bifidobacterium bifidum* на запропонованих та контрольному поживних середовищах наведено на рисунках 3.2 1А та 1Б.

За наведеними результатами доцільно використовувати для вирощування *Bifidobacterium bifidum* запропоноване модифіковане поживне середовище.

3.4 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Біфідобактерин належить до пробіотиків I покоління. Біфідобактерин - препарат на основі живих бактерій *B. bifidum*. В одній дозі його міститься не менш як 10^9 КУО/см³ живих клітин біфідобактерій штаму *B. bifidum* та допоміжні речовини: цукор кристалічний, молоко знежирене, желатин [59].



А)

Б)

Рис. 3.2. Культивування *Bifidobacterium bifidum*

А - на модифікованому поживному середовищі з додаванням по 6% запропонованих рослинних добавок;

Б – на кукурудзяно-лактозному середовищі (КЛС).

Препарат випускають у вигляді порошку для орального застосування у вигляді розчинів по 5 або 10 доз у флаконах No 10.

Це є кристалічна або пориста маса кремового кольору різної інтенсивності, можливий сірий відтінок з специфічним слабкокислим запахом і солодкуватим смаком. Масова частка вологи сухого препарату складає не більше 3,5%.

Загальна характеристика.

Основні властивості лікарської форми: порошок жовтого, білого або сірого кольору, кисломолочного запаху і смаку. При розчиненні у воді утворює непрозору суспензію.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		75

Склад на один флакон. Діюча речовина: ліофілізат живих біфідобактерій не менш $1 \cdot 10^8$ КУО в одній дозі.

Допоміжні речовини: цукроза, желатин, молоко сухе.

Форма випуску. Ліофілізований порошок.

Код АТС. А07F А. Антидіарейні мікробні препарати.

Показання до застосування. Біфідумбактерин застосовують для лікування дорослих і дітей з перших днів життя. Можна застосовувати при вагітності й лактації.

Препарат *B.bifidum*, як і Біфідумбактерин призначають:

- для лікування й профілактики дисбіозу кишечника, що виникає внаслідок антибактеріальної, гормональної, променевої й інших видів терапії, за стресових ситуацій та перебування у екстремальних умовах;
- у комплексному лікуванні гострих інфекційних захворювань кишечника (шигеліоз, сальмонельозні інфекції, ентерогенна інфекція, викликана *Escherichia coli*, інші бактеріальні та вірусні кишкові інфекції);
- для лікування реконвалесцентів після гострих кишкових інфекцій;
- для лікування бактеріальних харчових отруєнь стафілококової і невстановленої етіології;
- у комплексному лікуванні неінфекційного ентериту і коліту, синдрому подразненого кишечника, функціональних кишкових порушень;
- дітям з обтяженим преморбідним станом, що одержують антибіотики в ранньому неонатальному періоді;
- для лікування й профілактики дисбіозу у дітей хворих на пневмонію, сепсис та інші гнійно-інфекційні захворювання, анемію, рахіт, гіпотрофію тощо;
- для лікування й профілактики дисбіозу у дітей, матері яких страждали важкими токсикозами або іншою патологією вагітності, мали лактостаз, тріщини сосків, мастит і відновлюють годування грудьми після видужання;
- дітям, які переведені на штучне вигодовування з метою профілактики дисбіозу кишечника;

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		76

- для лікування й профілактики дисбіозу жіночої статеві сфери, що виникає внаслідок запальних процесів (вагініти, вульвіти), проведення антибактеріальної, гормональної, променевої й інших видів терапії, в період менопаузи тощо.

Для розведення препарату необхідно використовувати теплу кип'ячену воду з температурою не вище +40°C. Не можна зберігати препарат у розчиненому вигляді. При необхідності сухий вміст одного флакона або пакета розділяють на рівні частини. Необхідну кількість розчиняють і використовують, залишок сухої маси зберігають у холодильнику в закупореному флаконі.

Умови зберігання:

Зберігати у сухому, темному місці, при температурі від 2 до 8 °С.
Термін придатності 1 рік.

Пакування:

Ліофілізат живих біфідобактерій *B.bifidum* по 5 та 10 доз у флаконах або пакетах. Флакони (пакети) упаковані по 5 або 10 штук у картонній коробці.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		77

РОЗДІЛ 4
ПРОДУКТОВИЙ РОЗРАХУНОК І МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС
БІОСИНТЕЗУ

4.1 Продуктовий розрахунок виробництва пробіотичного препарату *Bifidobacterium bifidum*

Концентрація мікробних клітин при вирощуванні на модифікованому середовищі складає 9×10^{10} КУО/см³.

$$800\,000\,000 \times 10^8 / 900 \times 10^8 = 888\,888,9 \text{ см}^3$$

У флакони для лікування дозується 5 або 10 доз, тому

$$888\,888,9 \times 5 = 4\,444\,440 \text{ см}^3$$

З урахуванням 10% витрат на подальших процесах це становитиме 4666662 см³, що дорівнює 4666,67 л або дм³.

Для розрахування необхідного об'єму ферментера виходимо з загальної тривалості виробничого процесу отримання сухого препарату, яка становить 110 годин. Кількість робочих днів по даному препарату буде становити 31 добу, тоді кількість циклів:

$$N_{\text{циклів}} = (31 \times 24) / 110 = 6,76, \text{ тобто } 7 \text{ циклів.}$$

Кількість культуральної рідини на один цикл становитиме $4666,7 / 7 = 666,7$ дм³. Враховуючи $K_z = 0,7$ – об'єм ферментера відповідає 952,38 дм³. Тому можливо обрати два ферментера об'ємом по 500 дм³, або один об'ємом 1000 дм³.

Таким чином, згідно з розрахунку та з врахуванням втрат необхідно виготовляти 4666,7 дм³ культуральної рідини. Для цього доцільно використовувати 7 циклів на рік. Інші робочі дні використовуються для виготовлення інших видів пробіотиків. Для культивування *Bifidobacterium bifidum* обрано 2 ферментера по 500 дм³ з коефіцієнтом заповнення = 0,7, робочий об'єм кожного з яких становить $V_p = 350$ дм³.

4.2. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.

Виробниче культивування для накопичення біомаси *B. bifidum* здійснюють в 500 дм³ ферментері з коефіцієнтом заповнення 0,7. Робочий

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
						78
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		

об'єм ферментера становить: $V_{роб} = 500 \times 0,7 = 350 \text{ дм}^3$. Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання $333,35 \text{ дм}^3$ культуральної рідини в одному ферментаторі потрібно: $V_{роб.1} = 333,35 \times 0,1 = 33,4 \text{ дм}^3$ посівного матеріалу, а в двох- $66,7 \text{ дм}^3$. Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування у двох інокуляторах об'ємом 50 дм^3 з коефіцієнтом заповнення $0,7$. Для засіву інокуляторів для одержання $66,7 \text{ дм}^3$ культуральної рідини необхідно: $V_{роб.2} = 66,7 \times 0,1 = 6,7 \text{ дм}^3$ посівного матеріалу. Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в двох інокуляторів об'ємом по 5 дм^3 з коефіцієнтом заповнення $0,7$. Для одержання $6,7 \text{ дм}^3$ культуральної рідини потрібно напрацювати: $V_{роб.3} = 6,7 \times 0,1 = 0,67 \text{ дм}^3 = 670 \text{ см}^3$ посівного матеріалу. Таку кількість інокуляту можна одержати при культивуванні у колбах в лабораторії. Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого культивування *Bifidobacterium bifidum* ферментерах по 500 дм^3 з коефіцієнтом заповнення $0,7$ буде проходити в 2 етапи.

4.3 Матеріальний баланс на одну ферментацію

Таблиця 4.1 Матеріальний баланс на одну ферментацію

1. Приготування ПС для вирощування в інокуляторах (I генерація)			
Панкреатичний гідролізат казеїну	180,0	Нестерильне ПС	6,003
Екстракт пекарських дріжджів,г	30,0		
Глюкоза,г	3,0		
Лактоза, г	45,0		
Цистеїн, г	3,0		
NaCl, г	3,0		
MgSO ₄ ,г	15,0		
Аскорбінова кислота, г	3,0		
Ацетат натрію, г	1,8		
Лимоннокислий амоній, г	1,8		
Агар, г	4,5		
Вода, дм ³	до 6,003		
	Всього	Всього	6,003
2. Стерилізація ПС в автоклаві			
Нестерильне ПС	6,003	Стерильне ПС	6,003
	Всього	Всього	6,003
3. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторах по 50 дм ³ (II генерація)			
Стерильне ПС, дм ³	60,00	посівний матеріал	6,67

Продовження табл. 4.1

Посівний матеріал з I генерації	6,67	Стерильне ПС	60,0
Втрати (частка)	0,03	Втрати (кількість)	0,03
Всього	66,7	Всього	66,7
4. Приготування ПС для інокуляторів по 50 дм ³			
Пептон, г	480,0	Нестерильне ПС	66,7
Соева сироватка, г	360,0		
Пектинові олігосахариди, г	360,0		
Лактоза, г	300,0		
Цистеїн, г	12		
MgSO ₄ , г	120		
NaH ₂ PO ₄ , г	120		
K ₂ HPO ₄ , г	60		
Агар, г	60		
Вода, дм ³	до 60,0		
Всього	66,7	Всього	66,7
5. Стерилізація ПС для інокуляторів по 50 дм ³			
Нестерильне ПС, дм ³	66,7	Стерильне ПС, дм ³	70,0
Конденсат 5%	3,3	Втрат немає	
Всього	70,0	Всього	70,0
6. Вирощування посівного матеріалу в ферментерах по 500 дм ³			
Стерильне ПС	596,2	Посівний матеріал	70,0
Посівний матеріал з інокуляторів	70,0		
Втрати (частка)	0,5	Втрати (кількість)	0,5
Всього	666,7	Всього	666,7
7. Приготування ПС для двох ферментерів по 500 дм ³			
Пептон, г	4770,0	Нестерильне ПС	666,7
Соева сироватка, г	3577,0		
Пектинові олігосахариди, г	3577,0		
Лактоза, г	2981,0		
Цистеїн, г	119,2		
MgSO ₄ , г	1192,4		
NaH ₂ PO ₄ , г	1192,4		
K ₂ HPO ₄ , г	596,2		
Агар, г	596,2		
Вода, дм ³	до 566,2		
Всього	666,7	всього	666,7
8. Стерилізація ПС для ферментерів по 500 дм ³			
Нестерильне ПС	566,2	Стерильне ПС	596,0
Конденсат 5%	29,8	(втрат немає)	
Всього	596,0	Всього	596,0

Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата

КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3

Аркуш

80

4.4 Перелік обладнання для отримання пробіотичного препарату *B.bifidum*

Біологічний агент по відношенню до кисню є 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 апарат. 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 666,7 дм³, який утворюється при вирощуванні мікроорганізмів *B.bifidum*. 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 1000 дм³ або вибираємо два ферментера по 500 дм³.

Спеціальна 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. THALE AE 63-6300 л поставляється з цифровою системою вимірювання та управління параметрами процесу, датчиками температури, рН, рО₂ і чотирма вбудованими перистальтичними насосами.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		81

Блок управління ферментаційної системи виготовлений з нержавіючої сталі, і містить всі необхідні компоненти, перетворювач частоти, клапани, 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-орієнтованою 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 обрано інокулятори компанії Sartorius Stedim Systems та для виробничого культивування- ферментер компанії THALE AE 63-6300 л [10]. Рамна конструкція з нержавіючої сталі забезпечує простоту в обслуговуванні. Контроль показників рН, 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 пробіотичного препарату в промислових масштабах обрано наступні апарати: ферментери THALE AE 63-6300 об'ємом по 500 дм³, інокулятори об'ємом 50 дм³ та об'ємом 5 дм³.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		82

Розрахунки основного технологічного обладнання

Коефіцієнт заповнення, $K_3=0,7$

Робочий об'єм:

$$V_p = V_H \cdot K_3 \quad V_p = 0,5 \cdot 0,7 = 0,35 \text{ м}^3$$

При розрахунку визначають основні конструктивні та енергетичні показники ферментера за заданим загальним об'ємом.

Спочатку необхідно встановити об'ємну масу (ρ), динамічну в'язкість (μ), коефіцієнт теплопровідності (λ), робочий тиск у ферментері при стерилізації його паром, теплоємність (C).

Для поживних середовищ основною складовою яких є пептон, лактоза, соєва сироватка та яблучні інгредієнти ці параметри знаходяться в межах:

$$\rho = 1020 - 1070 \text{ кг/м}^3; \quad (4.1)$$

$$\mu = 0,00155 - 0,00166 \text{ Па} \cdot \text{с}; \quad \lambda = 0,6 \text{ Вт/(м} \cdot \text{К)}; \quad (4.2)$$

$$C = 4800 \text{ Дж/(кг} \cdot \text{К)} \quad (4.3)$$

Робочий тиск у ферментері при стерилізації приймають не менше 0,2 МПа. Коефіцієнт заповнення ферментера поживним середовищем залежно від складу середовища та від виду мікроорганізму, що вирощують $R = 0,7$

Конструктивний розрахунок ферментера.

Розраховують висоту циліндричної частини, загальну висоту разом з днищем та кришкою, а також висоту стовпа культуральної рідини, яка залежить від інтенсивності піноутворювання та пристрою для її гасіння. Для розрахунку циліндричної частини задаються внутрішнім діаметром, або співвідношенням $H_{ц}/R$.

За даними продуктових розрахунків було обрано апарат марки THALE AE 63-6300 л з діаметром $D_{вн} = 535$ мм та висотою $h = 1000$ мм

Робочий об'єм апарата (м^3) розраховують за формулою

$$V_p = V_{заг}/R \quad (4.4)$$

якщо $R = 0,7$, то $V_p = 0,4/0,7 = 0,535 \text{ м}^3$

Для виробництва амінокислот, харчових антибіотиків, ферментних препаратів висоту еліптичної частини приймають $h_{ел} = 0,25 D_{вн}$,

					<i>КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3</i>	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		83

$$h_{\text{сл}}=0,25*1020=255\text{мм} \quad (4.5)$$

Висота циліндричної частини ферментера, м:

$$H_{\text{ц}}=(V_{\text{р}}-2V_{\text{дн}})/F,=(1-2*0,054)/0,87=1,025\text{м} \quad (4.6)$$

де F – площа перетину ферментера за внутрішнім діаметром, м^2 :

$$F = 0,785 D_{\text{вн}}^2 = 0,785 1,05^2 = 0,87 \text{ м}^2 \quad (4.7)$$

Загальна висота ферментера, м:

$$H_{\text{заг}}=H_{\text{ц}}+2h_{\text{сл}} \quad (4.8)$$

Об'єм еліптичної частини:

$$V_{\text{дн}}=(P*D_{\text{вн}})/(2*\eta-0,5*P)=(0,1*1,05)/(2*1-0,5*0,1)=0,054 \text{ м}^3 \quad (4.9)$$

де P – внутрішній тиск в апараті, що не перевищує 0,25 МПа;

η – коефіцієнт міцності шва, $\eta = 0,75-1,0$.

До розрахованої висоти апарата додають розміри електродвигуна, редуктора. Висоту культуральної рідини в апараті розраховують за рівнянням:

$$H_{\text{к.рід}}=V*R-V_{\text{дн}}/0,785D_{\text{вн}}^2 \quad (4.10)$$

$$H_{\text{крід.}}=(1*0,59-0,054)/(0,785-1,05^2)=0,616\text{м}=616 \text{ мм.} \quad (4.11)$$

Конструктивний розрахунок механічної мішалки ферментера

При вирощуванні мікроорганізмів на рідких поживних середовищах глибинним способом рекомендується застосовувати турбінні мішалки.

Діаметр турбінної мішалки розраховують за формулою

$$d_{\text{м}}=(0,6-0,33)/D_{\text{вн}} \quad (4.12)$$

$$d_{\text{м}}=(0,6-0,33)*1020=612 \text{ мм} \quad (4.13)$$

Знаючи $d_{\text{м}}$, за каталогом вибирають мішалку з ефективною системою перемішування. Для перемішування середовища вязкістю $\mu = 0,00133 \text{ Па} \cdot \text{с}$ рекомендується окружна швидкість мешалки $w = 0,5 \text{ м/с}$

Частота обертання мішалки, хв^{-1} ,

$$\eta_1=W/\pi*d_i \quad (4.14)$$

де ω – колова швидкість мішалки, м/с .

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		84

$$n = 0,5 / (3,14 * 0,35) = 0,5 \text{ об/с.} \quad (4.15)$$

приймаємо $n = 0,5 \text{ об/с}$

За одержаною величиною частоти обертання мішалки приймають фактичну швидкість.

При роботі мішалки для перемішування культури, що росте без урахування впливу допоміжних пристроїв, потужність, яка споживається, кВт:

$$N = E_{um} * \rho_c * d^5 * n^3, \text{ Вт} \quad (4.16)$$

$$N = 0,3 * 1020 * 6^3 * 0,35^5 = 360 \text{ Вт} \quad (4.17)$$

де E_{ui} – критерій потужності, що залежить від інтенсивності перемішування і характеризується критерієм Рейнольдса (Re);

ρ_c – густина середовища, кг/м^3 ;

n – число обертів мішалки, хв ;

d – діаметр мішалки, м ;

Визначають режим перемішування по модифікованому числу Рейнольдса:

$$Re_m = \rho_c * n * d^2 / \mu_c \quad (4.18)$$

$$Re = 1050 * 6 * 0,35^2 / 0,0016 = 482343,75 \quad (4.41)$$

За графіком визначають значення числа Ейлера (потужності), що відповідає даній мішалці й режиму перемішування.

$$E_{ui} = 0,3$$

Настановна потужність електродвигуна (з урахуванням запасу потужності $K=1,2 \dots 1,6$ і к.к.д. передачі $\eta=0,8 \dots 0,9$)

$$N_{уст.} = K * N / \eta = 1,2 * 357 / 0,89 = 481 \text{ Вт} = 0,5 \text{ кВт} \quad (4.20)$$

За прийнятою величиною частоти обертання мішалки та потужністю за каталогом вибирають мотор-редуктор ЗМП-40-180-15-G320-Ц-УЗ, 380В.

Тепловий розрахунок ферментера

Робочий об'єм ферментера $V = 0,35 \text{ м}^3$, до складу поживного середовища

$$M_{л} = V * \rho * 0,05 = 0,350 * 1020 * 0,05 = 17,85 \text{ кг} \quad (4.21)$$

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		85

Тепловиділення при розщепленні складає близько 20 МДж/кг.

При умові, що час циклу дорівнює 24 години, кількість біологічного тепла, що виділяється цією культурою (теплова потужність охолоджуючого пристрою) складе:

$$Q_{\text{сек}} = M \cdot 20 \cdot 10^6 / (24 \cdot 3600) = 2314, \text{ Вт} \quad (4.22)$$

Щоб уникнути перегріву середовища виділяється тепло відводять. Тепло відводиться охолоджуючою водою $Q_{\text{вод}}$, повітрям $Q_{\text{пов.}}$, що подається на аерація культури, тепловипромінюванням $Q_{\text{п.}}$.

Тепловий баланс ферментера:

$$Q_{\text{сек}} = Q_{\text{вод}} + Q_{\text{возд}} + Q_{\text{п.}} \quad (4.23)$$

$Q_{\text{пов.}} = 0$ за відсутності подачі повітря

Втрати на тепловипромінювання в навколишнє середовище приймаємо 2% від Q :

$$Q_{\text{п.}} = 0,02 \cdot 2314 = 462 \text{ Вт} \quad (4.24)$$

Тепло, що відводиться водою:

$$Q_{\text{вод}} = Q_{\text{сек}} - Q_{\text{п.}} = 2314 - 462 = 1852 \text{ Вт} \quad (4.25)$$

Витрата води для відводу тепла (охолодження ферментера):

$$G_{\text{вод}} = \frac{Q_{\text{вод}}}{c \cdot (t_2 - t_1)} = \frac{1852}{4186 \cdot (22 - 15)} = 0,150 \text{ кг/с} \quad (4.26)$$

де t_1 і t_2 - температура води при вході в сорочку ($t_1 = 15 \text{ }^\circ\text{C}$) і при виході з сорочки ($t_2 = 22 \text{ }^\circ\text{C}$).

Потрібна поверхня охолодження ферментера:

$$F = \frac{Q_{\text{вод}}}{K \cdot \Delta t_{\text{cp}}}, \text{ де} \quad (4.27)$$

$$\Delta t_6 = 40 - 15 = 25^\circ$$

$$\Delta t_M = 40 - 22 = 18^\circ$$

$$\Delta t_6 / \Delta t_v = 25 / 18 < 2$$

Для даного випадку середня різниця температур теплоносіїв:

$$\Delta t_{\text{cp}} = (\Delta t_6 + \Delta t_M) / 2 = (25 + 18) / 2 = 21,5^\circ$$

(4.28)

За K приймаємо значення

$$K = 800 \text{ Вт}/(\text{м}^2 \cdot \text{К}) \quad (4.29)$$

					<i>КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3</i>	Аркуш
						86
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		

Забруднення стінок відкладеннями в процесі експлуатації призводить до погіршення коефіцієнта теплопередачі, тому для розрахунку приймаємо

$$K=700 \text{ Вт}/(\text{м}^2 \cdot \text{К}), \quad (4.30)$$

$$\text{тоді } F=1852/(700 \cdot 21,5)=0,55 \text{ м}^2. \quad (4.31)$$

При діаметрі корпусу ферментера $D_n = 1,05$ м висота сорочки:

$$H_p = F \pi \cdot D \quad (4.32)$$

$$H_p = 0,34 / (3,14 \cdot 1,05) = 0,103 \text{ м}$$

Висота сорочки має бути не менша за 103 мм, що при висоті циліндричної частини 1025 мм, дозволяє розташувати сорочку на циліндричній частині апарату.

Основні види обладнання, використаного на технологічній лінії для культивування мікроорганізмів *B.bifidum* наведено в табл. 4.2

Таблиця 4.2

Перелік обладнання для отримання пробіотичного препарату *B.bifidum*

№ з/п	Позначення	Найменування	Примітка
1	Дозатор	Ваговий дозатор СВЕДАДВС-301-70-1. Габарити 820x615x610 мм. Фірма ООО НПФ "Сведа, Лтд", Україна. Продуктивність 0,05 – 620 кг.	Об'ємно-ваговий дозатор
2	Реактор-змішувач для отримання 5% розчину NH ₃	Реактор-змішувач марки СМ500. Фірма «Станко Групп».	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
3	Реактор-змішувач для приготування розчинів, які містять термолабільні компоненти	Реактор-змішувач марки СМ500. Фірма «Станко Групп». В залежності від типу продукту мішалку всередині апарату можна змінювати. Підігрів відбувається за допомогою металічних ТЕНів.	Реактор-змішувач оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Об'єми 30 та 1500 л відповідно. Швидкість обертів мішалки 50-300 об/хв., сталь 12Х18Н10Т
4	Магнітни	Насос MS1 потужність 120-7600	

	йнасос	л/год, діаметр шлангу 4 см.	Насос з магнітною муфтою
5	Фільтр тонкого очищення	Фільтр для стерилізуючої фільтрації. Площа фільтрувального матеріалу 2,9 . Продуктивність – 1700м ³ /год.	Фільтруючий матеріал фторопласт
6	Реактор-змішувач для приготування модифікованого середовища	Реактор-змішувач марки СМ500. Фірма «Станко Груп». В залежності від типу продукту мішалку всередині апарату можна змінювати. Підігрів відбувається за допомогою металічних ТЕНів.	Реактор-змішувач оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 20 л, швидкість обертів мішалки 50-300 об/хв., сталь 12Х18Н10Т

7	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 50л. Потужність 1,5 кВт. Має клапан для відбору проб та механічний піногасник. Виробник Sartorius Stedim Systems (Німеччина).	Матеріал нержавіюча сталь 316L
8	THALE AE 63-6300 л	Ферментер. Циліндричний апарат з еліптичним днищем зверху привареною кришкою. Мішалка двоярусна, швидкість її обертання 3 с ⁻¹ . Апарат з нижнім зливом продукту. Містить 4 відбійні перегородки. Об'єм 500 л. Товщина стінки реактора 10 мм.	Матеріал нержавіюча сталь 316L

4.5 Викладення удосконаленого технологічного процесу

Виробництво препаратів пробіотиків, у тому числі препарату мікроорганізмів *V.bifidum* сухого, складається з наступних операцій:

1. Підготовка виробничих приміщень, 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 обов'язковий меддогляд. Безпосередньо на виробництві персоналу проводять інструктаж, щодо дотримання правил гігієни та санітарно – гігієнічних 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

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
<i>Зм</i>	<i>Аркуш</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		89

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 відміряємо 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.

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

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
						90
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		

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 робіт, 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 СІР мийка. В станцію СІР мийки завантажується робочий розчин дезінфікуючого засобу Біомой та дистильована вода. Вводяться параметри

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		91

обраних миючих розчинів температура. Відпрацьований миючий розчин направляється на знешкодження.

ДР 1.4.2. Обполіскування 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 легкої галогеновмісної речовини, зазвичай це чотирихлористий карбон або шестифтористий сульфат, закривають усю запірну арматуру та нагрівають апарат до 30 °С 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 2. Приготування та стерилізація апаратури та підлужнюючих розчинів.

ДР 2.1. Стерилізація апаратури та обладнання.

Після дезінфекції, ополіскування та перевірки обладнання та комунікацій на герметичність у ферментер подають насичену водяну пару, яку подають підтиском 0,28 – 0,3 МПа. Процес поділяють на три стадії. Попередньо в сорочку апарата подають глуху пару і прогрівають апарат до температури 80-90 °С. 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 °С 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 °С і надлишковому тиску $P=0,003 - 0,005$

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		92

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 мікробіоти.

ДР 2.2. Приготування 5% розчину NH₃

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

Для одного виробничого циклу необхідно приблизно 0,8 дм³ NH₃, який можна приготувати у вигляді 5% розчину як з концентрованого NH₃, так і з нашатирного спирту, який містить 10 % NH₃. Для приготування 1 дм³ 5% розчину NH₃ необхідно до 50 мл NH₃ додати 950 мл H₂O або додати до нашатирного спирту воду у співвідношенні 1:1. Оскільки при стерилізації утворюється конденсат, необхідно розрахувати це при додаванні води до компонентів ПС.

ДР 3. Підготовка та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Підготовка та стерилізація поживних середовищ для отримання посівного матеріалу.

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 6 дм³ поживного середовища Біфідум для одержання культури I генерації та 60 дм³ модифікованного ПС для одержання культури в інокуляторах II генерації та 566,2 дм³ модифікованного середовища для вирощування мікроорганізмів у ферментерах. Оскільки поживні середовища для культивування *B. bifidum* 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, а саме:

- композиція А термолабільних компонентів середовища (пептон, гідролізат молока, соєва сироватка, яблучні інгредієнти, L-цистеїн, лактоза, вода), яку стерилізують в автоклаві за температури 112⁰ С

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		93

упродовж 40 хвилин.

- композиція Б розчин солей, зокрема натрій хлористий, $MgSO_4$, NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 та вода, яку стерилізують в автоклаві за температури $131^\circ C$ упродовж 40 хвилин.

Після стерилізації проводять мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікробіоти.

Для культивування біфідобактерій використовують модифіковане поживне середовище, наступного складу (табл. 4.3).

Таблиця 4.3.

Рецептурний склад модифікованого ПС

Перелік інгредієнтів	Складові поживних середовищ, г/дм ³ (см ³ /дм ³)
Пептон	8,0
Лактоза	5,0
L-цистеїн	0,2
Агар	1,0
$MgSO_4$	2,0
NaH_2PO_4	2,0
K_2HPO_4	1,0
Соева сироватка	4-8
Яблучні інгредієнти	4-8
Вода	до 1,0 дм ³
pH	6,8 – 7,3

ТП 1. Одержання посівного матеріалу з 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 см³ на дозу). Вміст флакону ретельно перемішують та використовують для вирощування культури на ПС Біфідум [54].

З лабораторії отримуємо 667 мл посівної культури, яку готують з ліофілізованої музейної культури кафедри біохімії та мікробіології та фізіології харчування.

ТП 2. Вирощування культури I генерації на агаризованому середовищі.

Вирощену у середовищі Біфідум культуру штаму *B. bifidum* переносять у інокулятори по 5 дм³, які містять середовище Біфідум та вирощують за температури 38 ±1°C. Мікробіологічний контроль культури I 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 мікробіоти немає, то лабораторну культуру використовують як посівний матеріал для одержання культури наступної II генерації. Концентрацію живих клітин на кінець культивування повинна бути не менше ніж 10⁸ КУО/мл. Тривалість культивування культури 48 години .

ТП 3. Одержання культури II генерації в інокуляторах по 50 дм³.

Для вирощування посівного матеріалу штаму *B. bifidum* II генерації (6,67 дм³) використовують два інокулятора по 50 дм³. Вносять в асептичних умовах розраховані кількості композиції А та композиції Б. В асептичних умовах посівний матеріал культури I генерації, який накопичений у інокуляторах по 5 дм³ переносять в інокулятори по 50 дм³ з приготвленим та простерилізованим модифікованим поживним середовищем. Вирощування культури в інокуляторах відбувається до накопичення біомаси 10⁸ КУО/мл без перемішування, оскільки даний штам є анаеробом. Тривалість культивування становить 48 годин. При вирощуванні культури II генерації контролюють температуру (38 ± 1) °C. Мікробіологічний контроль культури II 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 II генерації використовують для виробничого культивування у ферментері.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
						95
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		

ТП 4. Вирощування культури *B.bifidum* у ферментерах по 500 дм³.

Для вирощування культури *B. bifidum* використовуються два ферментера об'ємом по 500 дм³ (THALE AE 63-6300 л). У попередньо простерилізовані ферментери вносять компоненти модифікованого ПС, а саме композиції А та композиції Б . Підготовлений посівний матеріал, в асептичних умовах, вносять в кількості не більше 10%. Процес культивування відбувається за температурою 38±1 °С. При вирощуванні посівного матеріалу в ферментерах контролюють температуру культивування (38±1) °С, концентрацію живих клітин (10⁹ КУО/мл), відсутність сторонньої мікробіоти та рН середовища культивування (рН = 7- 7,2,). Мікробіологічний контроль культури в ферментерах 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 мікробіоти немає, то культуру направляють у збірник напівфабрикату для наступного технологічного етапу- стабілізації. Коригування рН середовища здійснюють за допомогою 5% розчином NH₃.

ТП 5. Стабілізація напівфабрикату

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері на модифікованому середовищі за таких параметрів культивування: температура 38±1 °С; рН 6,8 – 7,3 (регулюють 5%-м розчином аміаку); надлишковий тиск 0,03 – 0,04 МПа; тривалість 10 – 14 год. Процес вирощування біфідобактерій у ферментері відбувається під тиском азоту. У процесі біосинтезу перемішувальний пристрій (70 об/хв) вмикають на кілька (2 – 3) хвилин тільки перед відбором проб та після подачі 5%-го розчину аміаку.

Через кожні 2 год культивування з ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю і визначення концентрації живих клітин. Процес культивування зупиняють після досягнення концентрації біфідобактерій на рівні 10⁹ КУО/см³.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		96

Для стабілізації культуральної рідини, одержаної на попередній стадії, додають захисне сахарозо-молочне середовище та розчин желатину і встановлюють рН 6,0 – 6,5 5%-м розчином аміаку, одержуючи напівфабрикат препарату мікроорганізмів *B.bifidum*. На цій стадії обов'язково здійснюють мікробіологічний контроль напівфабрикату на відсутність сторонньої мікробіоти.

У контрольній пробі після додавання стабілізуючого середовища перед висушуванням визначають:

- стерильність - відсутність сторонньої мікробіоти (бактерій і грибів);
- кількість живих біфідобактерій - в одній дозі препарату повинне міститися не менш 10^7 КУО/см³ живих бактерій;
- активність кислотоутворення - одна доза препарату біфідобактерій повинна утворювати кислоту не нижче 90 °Т;
- мікроскопічне дослідження - у мазках пофарбованих за Грамом повинні бути типові грампозитивні поліморфні палички з біфуркаціями на одному або двох кінцях, довжиною 4-5 мкм.

Для приготування сахарозо-молочного середовища знежирене молоко фільтрують для видалення механічних краплень, доводять рН до 7,4 – 7,6 (розчином аміаку), стерилізують за температури 121°С упродовж 45 хв, охолоджують до 35 – 40°С, додають сахарозу до кінцевої концентрації 30 – 32%, після чого знову стерилізують. Стерильність сахарозо-молочного середовища перевіряють висівом на МПА і середовище Сабуро як описано вище.

Щоб отримати розчин желатину, до сухого желатину додають дистильовану воду з розрахунку 1 дм³ води на 90 – 100 г желатину. Розчин ретельно перемішують і залишають для набухання за кімнатної температури на 3 год, після чого підігрівають на водяній бані (50 – 60 °С) до повного розчинення желатину і стерилізують.

ТП 6. Розлив напівфабрикату препарату *B.bifidum* у флакони на розливній машині KGS, флаконна лінія ВХКЗ, Лухан.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		97

Для підготовки первинного пакування препарату можна використовувати флаконну лінію ВХКЗ фірми Luxap. Лінія автоматично виконує подачу флаконів, заповнення їх водою, ультразвукове миття, захоплення і перевертання флаконів, зрошування водою та обдування всередині й зовні флаконів, підігрівання, сушіння, стерилізацію та охолодження флаконів. Під час миття застосовують комбіновану технологію очищення флаконів, що передбачає ультразвукове миття, зрошування водою й обдування флаконів повітрям високого тиску.

Операції з наповнення флаконів напівфабрикатом препарату мікроорганізмів *B.bifidum* здійснюють на розливній машині KGS, що входить до складу флаконної лінії ВХКЗ. Машину для розливу KGS лінійного типу оснащено V-подібними фіксаторами для орієнтації флаконів, тому розлив напівфабрикату відбувається синхронно під час руху флаконів. Машина KGS забезпечує пряме регулювання дози препарату на панелі керування, а рецептури дозування препаратів зберігаються у пам'яті мікропроцесора і можуть використовуватися повторно.

Напівфабрикат препарату мікроорганізмів *B.bifidum* розливають по 5 або 10 доз у флакони, вибірково контролюючи його на наявність сторонньої мікробіоти, і передають на наступну стадію.

ТП 7. Сублімаційне сушіння напівфабрикату препарату B.bifidum.

Цей етап складається з двох стадій: заморожування і сублімаційного сушіння. Напівфабрикат заморожують за температури $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ упродовж 18 – 24 год (залежно від завантаження апарата). Сублімаційне сушіння замороженого препарату здійснюють під вакуумом (26 Па). Через 40 год після початку процесу сушіння починають плавне підігрівання полиць сублімаційної установки на $1 - 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ за годину до досягнення температури $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, після чого збільшують підігрівання на $2 - 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ за годину до досягнення температури $32 - 34\text{ }^{\circ}\text{C}$. За цієї температури препарат витримують приблизно 6 год. Процес сушіння триває близько 96 год. Після цього флакони накривають гумовими пробками та передають на стадію закупорювання.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
						98
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		

ПМ 8. Пакування та маркування препарату, контроль якості готового препарату *B.bifidum*.

Випробування ліофілізованого препарату мікроорганізмів *B.bifidum* проводять, використовуючи наступні тести:

1. Опис – кристалічна або пориста маса різних відтінків бежевого або біло-сірого кольору.

2. Розчинність – при розчиненні в 0,9% розчині натрію хлориду з розрахунку 1 см³ на одну дозу препарат повинен розчинитися протягом 5 хв з утворенням непрозорої гомогенної суспензії.

3. рН – 6,0±0,5.

4. Втрата в масі при висушуванні – не більш 3,5%.

5. Мікробіологічна чистота – при мікроскопії мазків, пофарбованих за Грамом, повинні виявлятися грампозитивні поліморфні палички з біфуркацією на одному або двох кінцях. При посіві на середовищах не повинен виявлятися ріст грибів і бактерій.

6. Аномальна токсичність – контроль проводять пероральним введенням білим мишам 1 дози препарату.

7. Кількість живих біфідобактерій в одній дозі - в одній дозі препарату не менш 10⁹ КУО/см³ живих біфідобактерій.

8. Активність кислотоутворення бактерій – не менш 90°Т.

Зберігання отриманого препарату *B.bifidum* проводять при 2-8 °С.

ЗВ. Знешкодження відходів та промислових викидів.

Цей етап в постадійній схемі технології отримання пробіотичного препарату *B.bifidum* є важливим для охорони навколишнього середовища і збереження певного біотопу. Методи описані в розділі 5 підрозділі 5.1-методи очищення стічних вод при виробництві пробіотичного препарату *Bifidobacterium bifidum*.

4.6 Схема постадійного контролю біосинтезу *Bifidobacterium bifidum*

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
						99
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		

Для отримання якісної продукції, що відповідає усім зазначеним вимогам, здійснюється контроль виробництва. Важливі контрольні точки наведено в табл. 4.4.

Таблиця 4.4

Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що контролюється	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника, ISO 22000 HACCP ISO 9001:2015 ISO 14001:2015
ДР 1.1. Підготовка персоналу Км 1.1.1.	Руки виробничого персоналу. Мікробна контамінація	Мікробіологічний	1раз/ 2тижні	Клас В: КУО<10 Клас С: КУО≤25 Клас D КУО≤25
ДР 1.2.1.1 Приготування розчину Дезактину	Розчин Дезактин	Метод аналітичної хімії	Кожну операцію	C = 0,2 %, T = 5 діб, t = 40±5 °C
ДР1.3.1 Щоденне прибирання Кмб1.4.1.1	Кількість мікроорганізмів	Змиви з поверхонь	Після підготовки приміщень	Клас В: КУО<10; Клас С: КУО<100; Клас Д: КУО<200
ДР1.3.2 Генеральне прибирання Кмб1.4.2.1	Кількість мікроорганізмів	Змиви з поверхонь	Після підготовки приміщень	Клас В: КУО<10; Клас С: КУО<100; Клас Д: КУО<200
ДР1.4.2., ДР1.5.2. Миття та обполіскування обладнання Кт1.5.1.1, Кмб1.5.1.2, Кт1.5.2.1, Кмб1.5.2.2	Температура, мікробна контамінація	Термометр, мікробіологічний метод, висіви на чашки Петрі	Температура визначається під виробничого процесу	КУО < 2 τ = 10 хв t = 100°C P = 0,5 МПа
ДР 1.4.3. Технічний огляд та перевірка на герметичність Кт 1.5.3.1.	Ферментер	Манометр технічний	Тиск визначають безперервно під час перевірки на герметичність	P = 0,15-0,2МПа

Продовження табл. 4.4

ДР 2.1. Стерилізація обладнання Кт1.5.4.1, Кмб1.5.4.2	Тиск, температура	Манометр технічний, термометр, термоіндикатор	Кожну операцію	$t = 121 \text{ оС}$ $\tau = 1 \text{ год}$ $P = 0,2 \text{ МПа}$
ДР 2.1. Забір повітря Кт2.1.1	Повітря, що надходить з атмосфери	Пропускна здатність повітрязабірника	Кожну операцію	$[x]=2000 \text{ частинок/м}$
ДР 2.2. Приготування 5% розчину аміаку Кх 3.1., Кт 3.2	Аміак водний. Фільтри тонкого очищення	Ваги, мірний посуд. Годинник, манометр технічний, термометр, метод аналітичної хімії	Кожну операцію	$C = 5 \%$ $t = 131 \text{ }^\circ\text{С}$ $P = 0,15 \text{ МПа}$ $\tau = 45 \text{ хв}$
ДР 3 Приготування та стерилізація поживного середовища Кт 5.1.1., Кмб 5.1.2	Амінний азот рН Стерильність	Фізико-хімічний, потенціометричний, мікробіологічний	Кожну операцію	Амінний азот - 175–205 мг% рН = 6,8-7,3 $t = 70 \text{ }^\circ\text{С}$ $\tau = 30 \text{ хв}$ відсутність мікробіоти
ТП1. Введення музейної культури Кт 6.1.1., Км 6.1.2.	Температура Фізіолого-морфологічний стан культури	Термометр. Мікробіологічний - мікроскопіювання	Кожну операцію	$t = 38 \pm 1 \text{ }^\circ\text{С}$, відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 2 Отримання культури I генерації в інокуляторах по 5 дм ³ Кт 6.2.1., Км 6.2.2.	Температура. Час. рН. Мікробна контамінація	Термометр. Манометр. Годинник. Мікробіологічний - мікроскопіювання	Кожну операцію	$t = 38 \pm 1 \text{ }^\circ\text{С}$ $P = 0,15 \text{ МПа}$ $\tau = 24-48 \text{ год}$ рН = 7,0-7,2, відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 3. Отримання культури II генерації в інокуляторах по 50 дм ³ Кт 6.3.1., Км 6.3.2.	Температура. рН. Мікробна контамінація	Термометр. Манометр. Годинник. Мікробіологічний - мікроскопіювання	Кожну операцію	$t = 38 \pm 1 \text{ }^\circ\text{С}$ $P = 0,07 \text{ МПа}$ $\tau = 48 \text{ год}$ рН = 7,0-7,2, відсутність сторонньої мікробіоти

Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата

КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3

Аркуш

101

Продовження табл.4.4

ТП 4. Отримання культури в ферментерах по 500 дм ³ Кт 6.4.1., Км 6.4.2.	Ферментери з культурою. Температура. рН. Мікробна контамінація	Термометр. Манометр. Годинник. Мікробіологічний - мікроскопіювання	Кожну операцію	t = 38±1 °С P = 0,07 МПа τ = 10-14 год рН =6,8 -7,3, відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 5 Стабілізація культуральної рідини Км 8.1., Кт 8.2.	Культуральна рідина, рН. Мікробіологічна чистота.	рН-метр Мікробіологічний - мікроскопіювання	Кожну операцію	рН=6,0-6,5, Відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 6. Розлив у флакони Кт 9.1.	Об'єм у флаконі	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Автоматично	V < 10,0 мл
ТП 7. Ліофільне сушіння препарату Кт 10.1., Км 10.2.	Температура Тривалість процесу Тиск Вологість Мікробна контамінація	Температура, годинник, манометр, психрометр, мікробіологічний-мікроскопіювання	Кожну операцію	t = 32-34 оС рН=7,0-7,4 τ = 96 год P = 26,6 Па, відсутність сторонньої мікробіоти
ПМ Пакування флаконів з готовим продуктом в індивідуальні упаковки Кт 12.2.1.	Кількість флаконів у картонній коробці.	Візуально	Кожну операцію	n = 10шт
ЗВ. Знешкодження відходів та промислових викидів Кт 13.1	Концентрація відходів	Кількісний хімічний та мікробіологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до санітарних правил і норм Посилання

РОЗДІЛ 5

ОХОРОНА ПРАЦІ І НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

5.1 Методи очищення стічних вод при виробництві пробіотичного препарату *Bifidobacterium bifidum*

Очищення стічних вод є важливою складовою більшої частини виробничих процесів. Це особливо важливо в харчовій промисловості, де забруднені стічні води можуть містити велику кількість біологічно активних речовин, що можуть негативно впливати на навколишнє середовище.

Виробництво препарату біфідобактерину не є винятком. Біфідобактерин - це пробіотик, який використовується для покращення травлення та підтримки імунної системи. Однак, процес виробництва біфідобактерину може призводити до значних забруднень стічних вод, які містять велику кількість бактерій та інших органічних речовин.

Для очищення стічних вод від забруднень, що виникають при виробництві біфідобактерину, використовуються різні методи. Одним з найпоширеніших методів є біологічна очистка стічних вод. Цей метод використовує живі мікроорганізми для очищення стічних вод від забруднень. У процесі біологічної очищення стічні води потрапляють до спеціальних резервуарів, де живі мікроорганізми розкладають органічні речовини, що містяться у стічних водах. Після цього очищені стічні води відводяться в навколишнє середовище.

Однак, біологічна очистка стічних вод не завжди ефективна при виробництві біфідобактерину, оскільки цей процес може призводити до збільшення концентрації бактерій та інших мікроорганізмів у стічних водах. Тому в таких випадках можуть застосовувати інші методи очищення стічних вод.

Один з таких методів - це фізико-хімічна очистка стічних вод. Цей метод використовує різні процеси, такі як фільтрація, осадження, флокуляція та іонний обмін, для очищення стічних вод від забруднень. Фізико-хімічна очистка стічних вод може бути ефективною у виробництві біфідобактерину,

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		103

оскільки цей метод може допомогти знизити концентрацію бактерій та інших мікроорганізмів у стічних водах.

Крім того, можна використовувати комбіновані методи очищення стічних вод, які поєднують різні фізико-хімічні та біологічні процеси. Ці методи можуть бути особливо ефективними для виробництва біфідобактерину, оскільки вони дозволяють знизити концентрацію бактерій та інших мікроорганізмів у стічних водах, забезпечуючи при цьому ефективне очищення води від забруднень.

Наприклад, одним з комбінованих методів очищення стічних вод є метод біологічної очищення в поєднанні з активованою шламовою системою. Цей метод використовується для зниження концентрації органічних речовин, а також для забезпечення більш ефективного очищення стічних вод від бактерій та інших мікроорганізмів.

У виробництві біфідобактерину для біологічної очистки стічних вод можуть використовуватись специфічні штами біфідобактерій, а саме: *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*. Ці штами можуть мати здатність розкласти органічні речовини та забруднення, що дозволяє ефективно очищати стічні води і зменшувати негативний вплив на довкілля.

Вибір конкретних мікроорганізмів для очищення стічних вод залежить від конкретних умов і вимог виробництва, а також складу забруднень у стічних водах. Для біфідобактерину можуть використовуватись штами бактерій, які є природними представниками роду *Bifidobacterium*. Ці бактерії є анаеробними, тобто вони можуть розмножуватись та розкласти органічні речовини без наявності кисню.

Зазвичай для біологічної очистки стічних вод вибирають штами бактерій, які є стійкими до впливу забруднень і можуть ефективно розкласти органічні речовини. Деякі штами біфідобактерій мають такі властивості і можуть бути використані для очищення стічних вод при виробництві біфідобактерину.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		104

У виробництві біфідобактерину можуть бути використані різні мікроорганізми для очищення стічних вод, зокрема:

Бактерії роду *Bifidobacterium*, які є природними представниками кишкової флори людини. Вони мають здатність розкласти органічні речовини і виробляти корисні метаболіти.

Для очищення стічних вод можуть бути використані спеціально підібрані активовані бактеріальні культури, які мають високу активність у розкладанні органічних речовин. Ці культури можуть включати штами бактерій, таких як *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* та інші.

Мікроорганізми, що використовуються для біосорбції, такі як деякі види водоростей і гриби, мають здатність поглинати та утримувати забруднення на своїй поверхні. Це може бути використано для очищення стічних вод шляхом використання таких мікроорганізмів у спеціальних резервуарах або фільтрах.

Іноді використовують комбінацію різних мікроорганізмів для більш ефективного очищення стічних вод. Це може включати штами бактерій, грибів та інших мікроорганізмів, які взаємодіють між собою для розкладу різних забруднень.

Вибір конкретних мікроорганізмів для очищення стічних вод у виробництві біфідобактерину залежить від різних факторів, таких як склад забруднень у стічних водах, умови виробництва, наявність специфічних вимог щодо якості води тощо.

Наприклад, у випадку, коли стічні води містять специфічні забруднення, такі як важкі метали, спеціально підібрані штами бактерій або грибів можуть бути використані для біосорбції цих забруднень. Наприклад, деякі види грибів, такі як *Aspergillus*, *Trichoderma* або *Penicillium*, можуть виявляти високу здатність до поглинання важких металів.

Крім того, у деяких випадках використовуються комбінації різних мікроорганізмів для поліпшення ефективності очищення. Наприклад,

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		105

комбінація аеробних і анаеробних бактерій може дозволити ефективно очистити стічні води від різноманітних забруднень.

Загальна мета використання мікроорганізмів для очищення стічних вод у виробництві біфідобактерину полягає в ефективному розкладанні органічних речовин, зменшенні забруднень і поліпшенні якості стічних вод. Вибір конкретних мікроорганізмів визначається науковими дослідженнями та практичними випробуваннями для забезпечення оптимального процесу очищення з максимальною ефективністю та надійністю.

5.2 Виробничі фактори, що впливають на навколишнє середовище

При виробництві препарату Біфідобактерину, на навколишнє середовище можуть впливати наступні фактори:

Використання сировини. Виробництво Біфідобактерину може потребувати використання природних ресурсів, таких як молоко або глюкоза, для забезпечення середовища, необхідного для росту і розвитку біфідобактерій. Якщо ці ресурси отримуються з недосяжних джерел або промисловим способом, це може мати негативний вплив на навколишнє середовище.

Енергія. Процеси виробництва препарату Біфідобактерину можуть вимагати значних кількостей енергії для забезпечення оптимальних умов зростання бактерій. Якщо ця енергія виробляється з використанням невідновлюваних джерел, таких як кам'яне вугілля або нафта, це може призвести до викиду шкідливих парникових газів і спричинити забруднення повітря.

Використання хімічних речовин. Деякі процеси виробництва можуть включати використання хімічних речовин, таких як добрива, антибіотики або дезінфікуючі засоби, для підтримки оптимальних умов росту бактерій. Якщо ці речовини неконтрольовано викидаються або необробляються належним чином, вони можуть потрапити в навколишнє середовище і мати негативний вплив на водні ресурси або ґрунт.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		106

Утилізація відходів. Процес виробництва Біфідобактерину може породжувати відходи, такі як біомаса бактерій, використані культуральні середовища або інші матеріали, що були використані під час процесу. Правильна утилізація цих відходів є важливою, оскільки неконтрольоване скидання або неправильна обробка може призвести до забруднення ґрунту, водних джерел або повітря.

Водні ресурси. Виробництво Біфідобактерину може потребувати значних кількостей води, як для процесу ферментації, так і для миття та очищення устаткування. Якщо використання води неефективне або якщо відпрацьована вода не піддається належній очистці, це може призвести до надмірного споживання водних ресурсів або забруднення водних екосистем.

Викиди CO₂ та інших парникових газів. Під час процесу виробництва Біфідобактерину можуть виникати викиди парникових газів, зокрема вуглекислого газу (CO₂), які впливають на глобальне потепління і зміну клімату. Оптимізація процесу та впровадження енергоефективних технологій можуть допомогти знизити ці викиди.

Виробництво препарату Біфідобактерину повинно враховувати ці фактори та приділяти увагу сталим та екологічно відповідальним практикам, таким як використання відновлюваних джерел енергії, ефективне використання ресурсів, правильна утилізація відходів та контроль викидів в атмосферу.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		107

РОЗДІЛ 6

ЕКОНОМІЧНІ РОЗРАХУНКИ

6.1 Маркетингове дослідження ринку пробіотиків

Маркетингові дослідження – це система збору, обробки та аналізу інформативних даних про ситуацію на ринку для зменшення ризику підприємницької діяльності і прийняття відповідних обґрунтованих маркетингових рішень.

Роль досліджень полягає в обліку та оцінці потреб, запитів і попиту споживачів, створенні конкретної програми їх задоволення, враховуючи існуючу ситуацію на ринку, можливості фірми та її потенціал. Метою цих досліджень є виявлення ринкових можливостей підприємства, завоювання стабільних конкурентних позицій на ринку, зменшення ризику та збільшення шансів на результативний успіх всієї маркетингової діяльності. Кожну ринкову можливість потрібно оцінити з точки зору її відповідності цілям і наявним ресурсам фірми.

Пробіотики є комбінацією живих бактерій і дріжджів, які природним чином живуть в організмі [43,73]. Однак іноді людині потрібен додатковий прийом цих засобів, щоб боротися із хворобою, позбутися здуття живота або збалансувати курс антибіотиків.

В організмі людини є як добрі, так і погані бактерії, і пробіотики надзвичайно корисні для організму. У той час як погані бактерії можуть викликати захворювання, хороші бактерії (також відомі як пробіотики) займають місце та витісняють погані бактерії, щоб допомогти боротися із хворобою.

Пробіотики можуть містити різні мікроорганізми. Найбільш поширеними є бактерії, які належать до груп під назвою *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*. Інші бактерії також можуть бути використані як пробіотики, так і дріжджі, такі як *Saccharomyces boulardii*.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		108

Різні типи пробіотиків можуть мати різні ефекти. Наприклад, якщо певний вид *Lactobacillus* допомагає запобігти хворобі, це не обов'язково означає, що інший вид *Lactobacillus* або будь-який із пробіотиків *Bifidobacterium* буде робити те саме.

Приклади пробіотиків включають: «Лактобаланс»; «Ентерожерміна»; «Лінекс»; «Йогурт»; «Біфідумбактерин».

Широкий вибір пробіотичних продуктів на фармацевтичному ринку містить широкий спектр бактеріальних пробіотичних штамів [43,73]. Щоб скористатися перевагами, необхідно вибрати правильний варіант для вирішення конкретної проблеми зі здоров'ям. При пошуку кращих пробіотиків для покращення функції мікробіому кишечника слід звернути пильну увагу на:

- колонієутворюючі одиниці (кількість бактерій на дозу);
- типи бактеріальних штамів, що використовуються;
- як потрібно зберігати пробіотики;
- які штами та/або торгові марки були вивчені щодо їх ефективності.

Сьогодні одним з важливих питань сфери здоров'я є захворюваності людей на дисбактеріоз, що складають 90% населення країни. Пропонується широкий вибір продуктів, лікарських засобів, спрямованих на відновлення нормального біоценозу організму людини.

На сучасному фармацевтичному ринку представлено великий асортимент препаратів на основі нормальної мікробіоти людини. Нині пробіотики розглядаються як ефективний метод відновлення складу та функції біоценозу людини.

При аналізі світового ринку пробіотиків досліджено, що Італія – країна з найбільшим європейським ринком пробіотичних добавок (приблизно 500 млн. євро), Франція (104 млн. євро) займають середнє місце, найменше ринок розвинений у Польщі (72 млн. євро) та Німеччині (64 млн. євро).

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		109

За прогнозами компанії Euromonitor International, лідером зростання глобального ринку пробіотиків у вартісному вираженні залишаються США.

Пробіотики мають багато механізмів дії (головний – захист організму людини від інфекційних захворювань) та позитивні ефекти (найбільш поширені – позитивний вплив на шлунково кишковий тракт та рота вірусні інфекції).

Пробіотики об'єднують такі препарати – пробіотичні лікарські засоби, пробіотичні продукти харчування, що включають продукти харчування, дієтичні добавки, харчові добавки, та генетично модифіковані пробіотики. Для надання ефекту бактерії повинні бути живі у кількості – 10^6 – 10^9 .

Італія – країна з найбільшим європейським ринком пробіотичних добавок. Парадигма ринку пробіотичних препаратів – для прискорення процедури виходу свого лікарського засобу на ринок, в деяких випадках, виробники жертвують «статусом лікарський засіб» й реєструють його як дієтична добавка (лікарській засіб – «Ентерожерміна» та дієтична добавка – «Enterogermina», виробник – «Санофі-Авентіс», Франція).

В Україні пробіотик Біфідумбактерин виробляє невелика кількість фармацевтичних підприємств. Це ТОВ «БІОФАРМА», ТОВ «НВП АРІАДНА», ТОВ «Vivo-activ».

Пробіотик – це безрецептурна добавка або ліки, які містять живі культури «хороших» бактерій або дріжджів, які можуть бути корисними для здоров'я [43,73]. Вони можуть мати різні види пробіотичних продуктів у різних кількостях, внаслідок чого вартість у них може бути вищою або нижчою. Аналіз ринку показав, що ціни на окремі бренди та продукти різні, але роздрібна ціна пробіотичних продуктів у середньому становить 167 гривень. Здебільшого ціна на пробіотики варіюється від 43 до 615 гривень. Однак ціна на пробіотики, як і на будь-які інші добавки та медикаменти, може змінюватись в залежності від різних факторів.

Тому проблема розширення ринку таких лікарських засобів та подальше з'ясування відомостей про імунотропні властивості вже відомих речовин вважається актуальною.

6.2 Впровадження у виробництво результатів дослідження

У дипломному проекті наведені розрахунки для створення виробництва і реалізації пробіотичного препарату мікроорганізмів *B.bifidum* для фармацевтичної галузі. Проаналізована ситуація на ринку, закордонне та вітчизняне виробництво препаратів.

Препарат необхідний для лікування та профілактики дисбактеріозу, а також хронічних колітів, на які страждають приблизно 90 % людей в Україні, що сьогодні складає приблизно 32 млн дорослих та дітей.

Із аналізу стану фармацевтичного ринку лікарських засобів України лінія виробництва пробіотичного препарату мікроорганізмів *B.bifidum* планується в Одеській області.

Виробництво пробіотичного препарату мікроорганізмів *B.bifidum*, препарату I покоління – пробіотики на основі монокультур облигатної або факультативної нормобіоти планується на території біотехнологічного заводу, як прив'язка технологічного цеху у комплексне виробництво біотехнологічних препаратів. Обсяг виробництва складе 4666 кг.

6.3 Очікувані економічні результати

Метою економічної частини дипломного проекту є техніко-економічне обґрунтування виробництва пробіотичного препарату мікроорганізмів *B.bifidum* для використання у фармацевтичній галузі.

Для досягнення мети в роботі поставлені наступні завдання:

- провести аналіз ринку пробіотичних препаратів;
- розрахувати інвестиції у проект;
- розрахувати собівартість виробленої продукції;
- розрахувати оподаткований прибуток та чистий прибуток;
- розрахувати термін окупності інвестицій.

В роботі заплановано обсяг виробництва продукту за рік – 4666 кг.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		111

Коефіцієнт використання виробничої потужності розраховують за формулою:

$$Квп = ОВр\dot{ч} / ВП,$$

де ОВрч – річний обсяг виробництва продукції, кг

ВП – річна виробнича потужність, кг

Коефіцієнт використання обладнання за розрахунками складає 0,7.

Виробнича потужність складає:

$$ВП = 4666 / 0,7 = 6665,7 \text{ кг.}$$

Розрахуємо заробітну плату основним виробничим робітникам. Для виробництва 4666 кг пробіотичного препарату мікроорганізмів *B.bifidum* потрібно 10 робітників, оплата праці кожного за місяць складає 8 тис. грн.

Розрахуємо основну заробітну плату робітників за рік на виробництво 1 тонни продукції:

$$ЗПо = 8 * 10 * 12 = 960 \text{ тис. грн.}$$

Додаткова заробітна плата складає 15 % від основної:

$$ЗПд = 960 * 0,15 = 144 \text{ тис. грн.}$$

Відрахування на соціальні заходи складають 22% від суми основної і додаткової заробітної плати:

$$ЗПсз = (960 + 144) * 0,22 = 242,89 \text{ грн.}$$

Розрахуємо собівартість виробництва пробіотичного препарату Біфідобактерин.

Складемо калькуляцію на одну тонну виробленої продукції. Витрати за статтею «Сировина і основні матеріали» наведено у табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Вартість статті витрат «Основні матеріали»

Назва	Норма витрат, кг	Ціна за кг, грн	Загальна вартість, тис. грн
Пептон	8	1200	9,6
Лактоза	5	160	0,8
L-цистеїн	0,2	2000	0,4
Агар	1	200	0,2
MgSO ₄	2	20	0,04

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
						112
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		

Продовження табл. 6.1

NaH ₂ PO ₄	2	135	0,27
K ₂ HPO ₄	1	420	0,42
Соєва сироватка	8	115	0,92
Яблучні інгредієнти	8	25	0,2
Всього	-	-	12,85

Витрати за статтею «Допоміжні матеріали» наведено у табл. 6.2.

Таблиця 6.2

Вартість статті витрат «Допоміжні матеріали»

Найменування	Кількість, од	Ціна за од., грн	Загальна вартість, тис. грн
Флакони маркіровані по 5 г	200000	2	400
Коробки з флаконами (по 10 флаконів)	20000	1	20
Всього	-	-	420

Витрати за статтею «Паливо і енергія на технологічні потреби» наведено у табл.6.3.

Таблиця 6.3

Вартість статті витрат «Паливо і енергія на технологічні потреби»

Найменування	Одиниця вимірювання	Кількість на випуск	Ціна, грн	Загальна вартість, тис. грн
Електроенергія	кВт/год	3800	3,54	13,45
Вода	м ³	50	35,16	1,76
Всього	-	-	-	15,21

Розраховано витрати за статтею «Витрати на утримання і експлуатацію обладнання».

До витрат входять витрати утримання, амортизація, поточний ремонт обладнання та інструменту, утримання і ремонту обладнання, відшкодування зносу, інші затрати, котрі пов'язанні з утриманням та експлуатацією обладнання. За даними заводу їх норматив складає 100 % від основної заробітної плати: 960 * 1 = 960 грн.

Розрахуємо витрати за статтею «Загальновиробничі витрати», за даними заводу їх норматив складає 100 % від основної заробітної плати: $960 * 1 = 960$ грн.

Виробнича собівартість складає суму перелічених витрат, яка дорівнює: $12,85 + 420 + 15,21 + 960 + 144 + 242,89 + 960 + 960 = 3714,95$ тис. грн.

Розрахуємо витрати за статтею «Адміністративні витрати», які плануємо 3 % від виробничої собівартості: $3714,95 * 0,03 = 111,45$ грн.

Розрахуємо витрати за статтею «Витрати на збут», які плануємо 2 % від виробничої собівартості: $3714,95 * 0,02 = 74,3$ грн.

Розрахуємо витрати за статтею «Інші операційні затрати», які плануємо 2 % від виробничої собівартості: $3975 * 0,02 = 74,3$ грн.

Повна собівартість на 1 тону готового продукту (табл. 6.4).

Таблиця 6.4

Повна собівартість 1000 т пробіотичного препарату мікроорганізмів *B.bifidum*

Статті витрат	Вартість пробіотичного препарату мікроорганізмів <i>B.bifidum</i> , тис. грн
1. Сировина і основні матеріали	12,85
2. Допоміжні матеріали	420
3. Паливо і енергія на технологічні цілі	15,21
4. Основна заробітна платня виробничим працівникам	960
5. Додаткова заробітна платня виробничим працівникам	144
6. Відчислення на соціальні потреби	242,89
7. Затрати на утримання і експлуатацію обладнання	960
8. Загальновиробничі затрати	960
9. Виробнича собівартість	3714,95
10. Адміністративні затрати	111,45
11. Витрати на збут	74,3
12. Інші операційні витрати	74,3
13. Повна собівартість	3975

Розрахунок калькуляції собівартості 1 тонни пробіотичного препарату Біфідобактерин показав, що повна собівартість складає 3975 тис. грн, 3975 грн – 1 кг, собівартість однієї упаковки складає 198,75 грн.

Розрахуємо собівартість Пробиотичного препарату мікроорганізмів *B.bifidum* на весь обсяг (табл. 6.5).

Таблиця 6.5

Розрахунок собівартості реалізованої продукції

Найменування продукції	Річний обсяг виробництва, од.	Собівартість 1 уп, грн	Собівартість виробленої продукції, тис. грн
1	2	3	4
Пробиотичний препарат мікроорганізмів <i>B.bifidum</i>	93320	198,75	18547,35

Як показав аналіз ринку вартість аналогічної продукції у продажу у межах 140 – 340 грн.

Плануємо ціну Пробиотичного препарату мікроорганізмів *B.bifidum* за 1 упаковку- 250 грн. В роботі розраховано кількість упаковок у 4,66 тонни – 93320 одиниць.

Розрахуємо обсяг виробленої продукції, яку планується виробляти (табл. 6.6.).

Таблиця 6.6

Розрахунок обсягу виробленої продукції

Найменування продукції	Річний обсяг виробництва, од.	Дійсна оптова ціна 1 уп, грн	Обсяг виробленої продукції, тис. грн
1	2	3	4
пробиотичний препарат мікроорганізмів <i>B.bifidum</i>	93320	250	233300

Розрахуємо прибуток від виробництва та реалізації продукції пробиотичний препарат мікроорганізмів *B.bifidum*.

Оподаткований прибуток від збільшення обсягу виробництва продукції визначимо за формулою:

$$П = ВП - С, \quad (4)$$

де П – прибуток за рік, тис. грн.,

ВП – обсяг виробленої продукції, тис. грн.,

C – собівартість виробленої продукції, тис. грн.

$P = 23330 - 18547,35 = 47826,5$ тис. грн

Розрахуємо чистий прибуток за формулою:

$$ЧП = P - Пп, (5)$$

де P – оподаткований прибуток за рік, тис. грн.

$Пп$ – податок на прибуток (на 01.01.2023 року – 18%).

$ЧП = 4782,65 - (4782,65 * 0,18) = 3921,77$ тис грн.

В проекті планується закупка основного устаткування для оснащення лінії з отримання пробіотичного препарату мікроорганізмів *V.bifidum* у якості засобів профілактики та лікування дисбактеріозу шлунково-кишкового тракту. В результаті розрахунків підприємство може отримати чистий прибуток – 840,5 тис. грн, інвестиції у проект необхідні у розмірі 3780,1 тис. грн., строк окупності яких складає 0,96 року.

6.4 Визначення інноваційного бюджету та інвестицій у виробництво

Підприємство може створювати інноваційний бюджет на розробку інновацій та впровадження інноваційних проектів у виробництво.

Витрати на інновації – це фактичні витрати, що пов'язані зі здійсненням різних видів інноваційної діяльності, що виконується в масштабі підприємства. Сума витрат закладається у загальний розмір інвестицій.

В роботі планується інноваційний бюджет ($Iб$) у розмірі 50 тис. грн на розробки та підготовку персоналу до впровадження нового продукту.

Розрахуємо інвестиції у проект виробництва.

У загальному вигляді суму інвестицій (I) визначають за формулою:

$$I = Iб + I_{\text{буд}} + V_{\text{уст}} + T + M + H + V_{\text{зал}} + Д - Л + \Delta ОА,$$

де $I_{\text{буд}}$ – витрати на будівельні роботи,

$V_{\text{уст}}$ – вартість придбання устаткування;

T – транспортні витрати по устаткуванню (5 % від вартості придбання устаткування);

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
						116
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		

М – вартість монтажу устаткування (10 %) від вартості придбання устаткування);

Н – невраховані витрати (2 % від вартості придбання устаткування, тис. грн.);

$V_{ЗАЛ}$ – залишкова вартість демонтованого устаткування, тис. грн. Залишкова вартість демонтується обладнання: якщо обладнання має 100% знос, то вона дорівнює 0, якщо немає, то враховується в капітальні вкладення, як недоамортизована вартість в розмірі відсотка зносу, який залишився;

Д – вартість демонтажу, тис. грн. (5 % від первісної вартості демонтованого устаткування);

Л – ліквідаційна вартість демонтованого устаткування. Якщо обладнання, що демонтується продається або здається на брухт, то ліквідаційна вартість розраховується, з урахуванням сплати податку на прибуток від продажу.

ΔОА – приріст власних обігових активів, тис. грн.

Для культивування *B.bifidum* з метою отримання пробіотичного препарату мікроорганізмів *B.bifidum* в промислових масштабах необхідно наступне обладнання (табл. 6.7).

Таблиця 6.7

Перелік обладнання для виробництва пробіотичного препарату мікроорганізмів *B.bifidum*

Обладнання	Кількість, од	Вартість 1 од., тис. грн	Вартість всього, тис. грн
Збірник змішувач	1	95	95
Збірник витримувач	1	85	85
Стерилізатор	4	26	104
Колби для лабораторного вирощування посівної культури (750 мл.)	5	1	5
Інокулятор об'ємом 5 л	2	26	52
Проміжний збірник поживного середовища	3	35	105
Інокулятор об'ємом 50 л	2	45	90
Ферментери об'ємом 500 л	2	19,5	39

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
						117
<i>Зм</i>	<i>Аркуш</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

Продовження табл .6.7

Збірник напівфабрикату	1	18	18
Флакони із біомасою у захисному середовищі	20	10	200
Ліофільна сушарка	1	85	85
Пакувальна установка	1	70	70
Всього			948

За умовами виробників обладнання транспортні витрати по устаткуванню (Т) та вартість монтажу устаткування враховано до вартості придбання устаткування.

Інвестиції, які необхідні на придбання нової технологічної лінії з виробництва пробіотичного препарату мікроорганізмів *B.bifidum*:

$$V_{уст} = 948 \text{ тис. грн.}$$

$$\Delta OA = C_{заг} * k,$$

де $C_{заг}$ – загальна собівартість готової продукції;

k – частка обігових активів (%).

Частка матеріальних витрат у собівартості продукції становить 60-80%. Однак для пускової партії планованого обсягу продукції досить 15 – 25% на покупку необхідних обігових активів, приймаємо 15 %:

$$\Delta OA = 18547,35 * 0,25 = 4636,35 \text{ тис. грн.}$$

Розрахуємо капітальні вкладення у проект виробництва пробіотичного препарату мікроорганізмів *B.bifidum*:

$$I = 50 + 948 + 4636,35 = 5634,84 \text{ тис. грн.}$$

Розрахуємо термін окупності капітальних вкладень.

Термін окупності капітальних вкладень визначаємо за формулою:

$$T = I / ЧП, \quad (6)$$

де I – інвестиції у проект, тис. грн.;

$ЧП$ – чистий прибуток, тис. грн.

$$T = 5634,84 / 3921,77 = 1,44 \text{ року.}$$

З економічних розрахунків отримуємо термін окупності виробництва пробіотичного препарату мікроорганізмів *B.bifidum* – 1,44 років.

Техніко-економічні показники проекту виробництва пробіотичного препарату
мікроорганізмів *B.bifidum*

Найменування показників	Значення показників
1. Виробнича потужність, кг	4666
2. Обсяг виробленої продукції у флаконах на рік (G, тис.)	933,2
3. Обсяг виробленої продукції, тис. грн.	23330
4. Собівартість виробленої продукції, тис. грн.	18547,35
5. Оподаткований прибуток, тис. грн.	4782,65
6. Чистий прибуток, тис. грн.	3921,77
7. Чисельність працюючих, люд.	10
8. Середньорічний виробіток одного працівника, тис. грн.	2333
9. Інвестиції, тис. грн.	5634,84
10. Строк окупності інвестицій, років	1,44

ВИСНОВКИ

В результаті установки технологічної лінії для виробництва пробіотичного препарату мікроорганізмів *B.bifidum* обсяг виробленої продукції цеху виробництва пробіотичного препарату біфідобактерій складе 4666 кг, що в грошовому вираженні складає 23330 тис. грн. Собівартість виробленої продукції складає 18547,35 тис. грн. Прибуток після установки цеху складає 4782,65 тис. грн., з якого чистий прибуток складає 3921,77 тис. грн. інвестиції у проект необхідні у сумі 5634,84 тис. грн., строк окупності яких складе 1,44 року, що є у межах нормативного терміну.

Всі розраховані показники дозволяють стверджувати, що виробництво пробіотичного препарату мікроорганізмів *B.bifidum* на комплексному біотехнологічному заводі є ефективним та економічно вигідним.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		119

ВИСНОВКИ

1. Проведено аналіз літератури щодо виробництва стандартизованих мікробних препаратів та обґрунтовано необхідність у пробіотичних препаратах.
2. Охарактеризовані форми та технології отримання пробіотичних препаратів, склад та якість поживних середовищ.
3. Наведено детальний опис особливостей технології отримання пробіотичного препарату мікроорганізмів *B.bifidum*.
4. Проведено дослідження росту *Bifidobacterium bifidum* на традиційних відомих поживних середовищах для культивування біфідобактерій та порівняльний аналіз цих показників при використанні поживних середовищ з модифікованим складом.
5. Проведено технологічні розрахунки й аналіз інвестиційної привабливості проєкту.
6. Розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва.
7. Обґрунтовано вибір ферментера для приготування поживних середовищ та наведено технологічний та конструктивний розрахунки
8. Надано рекомендації щодо застосування препарату мікроорганізмів *B.bifidum*.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		120

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Аброт О. Б. Методичні вказівки до лабораторних робіт з навчальної дисципліни «Мікробіологія». – Івано-Франківськ, 2016. – 70 с.
2. Балаклієц Н. І. Загальна мікробіологія.: Навч. посібник., Харківський мед. ун-т: Основа, 2001 – 258с.
3. Біотехнологія: підручник / Під ред. В. Г. Герасименка. – К.: Фірма «ІНКОС», 2006. – 647 с.
4. Боднарчук О. В. Наукове обґрунтування та розробка біотехнологій бактеріальних препаратів для ферментованих молочно-жирових продуктів: автореф. дис. д. тех. н. – К., 2019. – 42 с.
5. Борщ С. К. Диференційоване використання пробіотиків для антагоністичного впливу на грампозитивні бактерії у лікуванні кишкових інфекцій і синдрому дисбактеріозу кишечника // Ліки України. – 2008. - № 6 (122). – С. 69 – 74.
6. Васильєва К. О., Гарбуз А. В., Волошина І. М. Антагоністичні властивості біфідобактерій // Міжнародний науковий журнал «Освіта і наука». – 2020. – В. 2 (29). – С. 7 – 10.
7. Васіна Л. М. Мікробіологія: навч.-метод. посібник. – Чернівці: Чернівецький національний університет, 2020. – 88 с.
8. Гужвинська С. О., Палій А. П. Біологічні властивості лактобактерій і біфідобактерій // Ветеринарна біотехнологія. – 2018. - № 32 (1). – С. 92 – 98.
9. Гуляєв В. М., Філімоненко О. Ю. Конспект лекцій з дисципліни «Технології біофармацевтичних препаратів» для здобувачів вищої освіти за освітньою-професійною програмою «Біотехнології та біоінженерія». – Кам'янське, 2019. – 156 с.
10. [Thaletec Reactors AE RUS.pdf - Google Диск](#)
11. Дехтяренко Н. В., Шинкаренко Л. М., Дуган О. М. Критерії відбору пробіотичних штамів мікроорганізмів // Наукові записки. – 2007. – Т. 67. – С. 30 – 36.
12. ДСТУ 2212-2003 «Молочна промисловість. Молоко і кисломолочні продукти. Терміни та визначення» // Держстандарт України. – Київ, 1993. – 46 с.
13. Калініченко С. В. Сучасний стан розробки та застосування пробіотичних, пребіотичних та синбіотичних препаратів (огляд літератури) // Ан. Мечниківського інституту. – 2013. – № 3. – С. 5 – 12.
14. Калініченко С. В., Бабич Є. М., Рижкова Т. А. та ін. Сучасний стан розробки та застосування пробіотичних, пребіотичних та синбіотичних препаратів (огляд літератури) // Annals of Mechnikov Institute. – 2013. - № 3. – С. 5 – 12.
15. Калініченко С. В., Коротких О. О., Тіщенко І. Ю. Сучасні напрямки створення та удосконалення пробіотиків // Український біофармацевтичний журнал. – 2016. - № 1 (42). – С. 4 – 10.
16. Калініченко С. В., Коротких О. О., Тіщенко І. Ю. Порушення мікроекології та її сучасна корекція. Огляд // Український біофармацевтичний журнал. – 2016. - № 2 (43). – С. 6 – 12.
17. Капрельянц Л. В., Іоргачова К. Г. Функціональні продукти – Одеса: Друк, 2003. – 312 с.
18. Капрельянц Л. В., Шестобитов В. В., Рекичанская Л. В. Углеводные пробиотические вещества из сои // Зерновые продукты и комбикорма. – 2005. – № 2. – С. 18 – 20.
19. Капрельянц Л. В., Труфкаті Л. В., Крупицька Л. О. Поживне середовище для культивування бактерій роду *Bifidobacterium* на основі рослинної сировини // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. – 2015. – Т. 17, № 4 (64). – С. 41 – 54.
20. Капрельянц Л. Функціональні продукти і нутрицевтики – сучасні підходи харчової науки // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2016. – Вип. 73. – С. 441 – 448.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		121

21. Капрельянц Л. В., Труфкаті Л. В., Крупицька Л. О. Поживне середовище для підрахунку кількості життєздатних клітин біфідобактерій у продуктах харчування та препаратах пробіотичного призначення // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. – 2016. – Т. 18, № 1 (65). – С. 70 – 75.

22. Капрельянц Л. В., Пилипенко Л. М., Єгорова А. В. та ін. Технічна мікробіологія: Підручник. – Херсон: Олді-Плюс, 2017. – 430 с.

23. Капрельянц Л. В., Пожиткова Л. Г., Жук О. В., Білик О. А. Функціональні продукти: генезис, сучасний стан і тенденції // Харчова промисловість. – 2020. - № 27. – С. 7 – 20.

24. Коваленко Н. К. Кисломолочные продукты, их качество и влияние на здоровье человека // Проблемы харчування. – 2003. – №1. – С. 78 – 81.

25. Кордон Т. І. Принципи створення, механізм дії та клінічне застосування пробіотиків. Огляд // Аналі Мечніковського інституту. – 2014. - № 4. – С. 8 – 16.

26. Краснопольський Ю. М., Пилипенко Д. М. Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм: навчальний посібник для студентів біотехнологічних спеціальностей. – Харків: ТОВ «ДРУКАРНЯ МАДРИД», 2020. – 279 с.

27. Краснопольський Ю. М., Пилипенко Д. М. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу «Біотехнологія фармакологічно активних інгредієнтів» для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» – Харків: НТУ «ХПІ», 2021. – 49 с.

28. Кривко Ю. Я., Корнійчук О. П., Федорович У. М. Мікробіологія з основами імунології та технікою мікробіологічних досліджень: Електронний посібник. – Львів. 2021. – 540 с.

29. Крисенко О. В., Скляр Т. В., Вінніков А. І. та ін. Мікробіологічні аспекти пробіотичних препаратів // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. – 2010. – В. 18, т.2. – С. 19 – 24.

30. Купко Н. Пробиотичні препарати: обґрунтування застосування в педіатричній практиці // Дитячий лікар. – 2016. - № 2 (47). – С. 35 – 41.

31. Левицкий А. П., Волянский Ю. Л., К. В. Скидан. Пребиотики и проблема дисбактериоза. – Х.: ЭДЭНА, 2008. – 100 с.

32. Леженко Г. О., Пашкова О. Є. Місце синбіотиків у терапії та профілактиці антибіотик-асоційованої діареї у дітей // Современная педиатрия. – 2014. - № 6 (62). – С. 89 – 94.

33. Лясковский Т. М., Подгорский В. С. Оценка пробиотиков согласно рекомендациям международных организаций (FAO/WHO) // Мікробіол. журн. – 2005. – Т. 67, № 6. – С. 104 – 112.

34. Лях В. Р., Червенцова В. Г., Кричковська А. М. Пробиотики як сучасні превентивні препарати захворювань шлунково-кишкового тракту // Chemistry, Technology and Application of Substance. – Lviv: Lviv Politechnic Publishing House. – 2018. – Vol. 1, No. 1. – P. 72 – 77.

35. Майданник В. Г., Іванишин Л. М. Клінічні рекомендації з діагностики та лікування функціональних гастроінтестинальних розладів у дітей. – К., 2013. – 66 с.

36. Макаренко О. М., Петров П. І., Лугіна С. В. Сучасний погляд на проблему профілактики та лікування дисбактеріозу // Вісник ВДНЗУ «Українська медична стоматологія». – 2010. – Т. 16, в. 2 (54). – С. 294 – 300.

37. Малькова М. Г. Технологія виробництва галактуранових олігосахаридів із пектиновмісної сировини // Харчова наука і технологія. - Одеса: ОНАХТ. 2010. - № 1 (10). - С. 58–61.

38. МВК 10.10.2.2-119-2005. Методичні вказівки з методів контролю. Визначення кількості біфідобактерій у кисломолочних продуктах. – Київ, 2005. – 20 с

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		122

39. Мотренко В. В., Луценко Т. М., Дронько Л. М. Біотехнологія та біоінженерія. Частина 1. Основи біотехнології. Рекомендації до виконання практичних робіт: Навчальний посібник. – К.: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2022. – 96 с.
40. Наказ від 16 лютого 2009 року N 95. Про затвердження документів з питань забезпечення якості лікарських засобів. – К., 2009. – 23 с.
41. Невмиваний С. Л. Розробка біотехнології ферментованих соєпродуктів: дис...канд. тех. наук: 03.00 .20. – Одеса: Одеська держ. академія харчових технологій. - О., 2002. - 166 с.
42. Няньковський С., Шаєвська Х., Заричанський Я. Роль пробіотиків у профілактиці і лікуванні захворювань у дітей та дорослих // *Здоров'я України* – 2005. – № 8. – С.40 – 41.
43. Осадчий А. І. Вплив пробіотиків на здоров'я людини: від народження до зрілості // *Український медичний часопис*. – 2019. - № 6 (134).
44. Парняк Р. П., Калин Б. М., Нагірняк Т. Б. Значення та доцільність застосування пробіотиків // *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького*. – 2018. – Т. 20, № 87. – С. 117 – 121.
45. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
46. Полтавська О. А. Біологічні властивості біфідобактерій, ізольованих з різних природних джерел: дис. канд.біол.наук: 03.00.07. – К., 2006. – 133с.
47. Полтавська О. А., Коваленко Н. К. Біфідобактерії і їх біологічні властивості // *Мікробіологія і біотехнологія*. – 2008. - № 1. – С. 8 – 17.
48. Полянский К. К., Глаголева В. Э., Ряховский Ю. В. Пищевые волокна в молочных продуктах // *Молочная промышленность*. – 2001. - № 6. – С. 41.
49. Пробиотики и пребиотики [Електронний ресурс] // Всемирная гастроэнтерологическая организация (WGO). Практические рекомендации. – 2008. Режим доступу: <http://www.gastroscan.ru/literature/authors/5634>.
50. Романюк Л. Б., Кравець Н. Я., Климнюк С. І. та ін. Антибіотикорезистентність умовно-патогенних мікроорганізмів: актуальність, умови виникнення, шляхи подолання // *Інфекційні хвороби*. – 2019. - № 4 (98). – С. 63 – 71. DOI
51. Сахнюк О. М., Сурмашева О. В., Кривошлик М. О. Молочнокислі бактерії у корекції дисбіозів людини та сучасні проблеми створення пробіотичних препаратів (огляд літератури) // *Environment and Health*. – 2012. - № 2. – С. 47 – 53.
52. Смирнов В. В., Коваленко Н. К., Подгорский В. С., Сорокулова И. Б. Пробиотики на основе живых культур микроорганизмов // *Микробиол. журн.* 2002. – В. 64, № 4. – С. 62 – 80.
53. Соломон А. М., Казмірук Н. М., Тузова С. Д. Мікробіологія харчових виробництв: навчальний посібник для студентів напряму підготовки «Харчові технології». – Вінниця: РВВ ВНАУ, 2020. – 312 с.
54. Соломон А. М. Нові аспекти виробництва кисломолочних продуктів з пробіотичними властивостями // *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Харчові технології*. – 2022. – Т. 24, № 98. – С. 50 – 56.
55. Старовойтова С. О., Горчаков В. Ю. Пробиотики – промотори життя XXI століття // *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. – 2006. - № 2. – С. 104 – 114.
56. Старовойтова С. О., Тимошок Н. О., Горчаков В. Ю., Співак М. Я. Імуномодулюючі властивості бактерій роду *Lactobacillus* // *Мікробіологічний журнал* – 2009. – Т. 71, № 3. – С. 41 – 47.
57. Старовойтова С. О. Холестеразна активність молочнокислих бактерій *in vitro* та *in vivo* // *Біотехнологія*. – 2012. - № 4 (43). – С. 177 – 183.
58. Старовойтова С. О., Скроцька О. І., Пенчук Ю. М., Пирог Т. П. Технологія пробіотиків: Підручник. – К.: НУХТ, 2012. – 318 с.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		123

59. Старовойтова С. О., Скороцька О. І., Пенчук Ю. М., Дорошко Ю. М. Технологічні аспекти одержання пробіотиків // НУХТ. – 2014. - № 3. – С. 5 – 13.
60. Страшнова І. В., Ямборко Г. В., Васильєва Н. Ю. Антагоністична активність пробіотичних штамів лактобацил за сумісного культивування // Мікробіологія і біотехнологія. – 2022. - № 1. – С. 45 – 57.
61. Танащук С. В., Савченко О. А., Подосинников А. Р. Основные характеристики лактулозы, как функционального ингредиента // Молочное Дело. – 2005. – № 9. – С. 38 – 39.
62. Ткаченко Н. А., Куренкова О. А., Касьянова А. Ю. Спреди з синбіотичними властивостями – нові продукти олійно-жирової галузі // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Ґжицького. – 2015. – Т. 16, № 1 (6). – С. 116 – 127.
63. Уманець Т. Р. Імуномодуючі ефекти пробіотиків // Український медичний часопис. – 2017. - № 2 (118).
64. Філімоненко О. Ю. Конспект лекцій з дисципліни «Біохімічні основи мікробного синтезу» для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія». – Дніпродзержинськ, 2016. – 183 с.
65. Хайтович М. В. Імуномодуюча та протизапальна дія пробіотиків: клінічне значення // Гастроентерологія. – 2020. - № 1 (470). – С. 22 – 23.
66. Хижняк О. С., Краснопольський Ю. М. Біотехнологічні аспекти створення препаратів на основі пробіотиків // Технологии органических и неорганических веществ и экология. – 2012. - № 44 (950). – С. 72 – 78.
67. Хижняк О. С., Краснопольський Ю. М. Біотехнологічні аспекти отримання комплексного препарату, який містить різні штами пробіотичних культур // Вісник НТУ «ХП». – 2013. – № 4 (978). – С. 113 – 120.
68. Христич Т. Н. Микробиоценоз кишечника: механизмы развития, клиника дисбиоза и возможная коррекция его нарушений // Сучасна гастроентерологія. – 2010. - № 1 (51). – С. 86 – 91.
- 68.a Христич Т. Н. Микробиоценоз кишечника: механизмы развития, клиника дисбиоза и возможная коррекция его нарушений // Сучасна гастроентерологія. – 2010. - № 1 (51). – С. 86 – 91.
69. Шенцова М. О., Сурмашева О. В. Пробиотичні препарати, їхня якість та безпека: сучасний стан проблеми // Environment and Health. – 2013. - № 4. – С. 74 – 79.
70. Ширококов В. П., Янковський Д. С., Димент Г. С. Мікробіом людини та сучасні методи його оздоровлення // С. 64 – 69.
71. Юлевич О. І. Загальна біотехнологія. Методичні рекомендації для самостійного вивчення дисципліни і виконання лабораторно-практичних робіт студентами денної форми навчання напряму підготовки 6.05.401 – «Біотехнологія». – Миколаїв, 2015. – 157 с.
72. Янковский Д. С., Дымент Г. С. Микрофлора и здоровье человека. – К.: ТОВ «Червона Рута-Турс», 2008. – 552 с.
73. Янковський Д. С., Димент Г. С. Пробиотики: актуальні питання конструювання і клінічного застосування // Пробиотики. – 2015. - № 4. – С. 18 – 30.
74. Akter S., Park J-H., Jung H. K. Potential health-promoting benefits of paraprobiotics, inactivated probiotic cells // Food Microbiology and Biotechnology. – 2020. – No. 30 (4). – P. 477 – 481.
75. Albertini B., Vitali B., Passerini N. et al. Development of microcapsulate systems for intestinal delivery of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis // Eur. J. Pharmac. Sci. — 2010. — Vol. 40. — P. 359 — 366.
76. Ambalam P., Kondepudi K.K., Balusupati P., Nilsson I., Wadstrom T., Ljungh A. Prebiotic preferences of human lactobacilli strains in co-culture with bifidobacteria and antimicrobial activity against Clostridium difficile // Journal of Applied Microbiology. – 2015. – Vol. 119 (6). – P. 1672 – 271682. <https://doi.org/10.1111/jam.12953>

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		124

77. Anal A. K., Singh H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial application and targeted delivery // Trends Food Sci. Technol. — 2007. — Vol. 18. — P. 240 — 251.
78. Bested A. C. Intestinal microbiota, probiotics and mental health // Gut Pathog. — 2013. — No 5. — P. 3 — 7.
79. Biavati B. The Family *Bifidobacteriaceae* // The Prokaryotes. Third Edition: a handbook on the Biology of Bacteria: Synbiotic Association, Biotechnology, Applied Microbiology / B. Biavati, P. Mattarelli. — Singapore: Springer Science, 2006. — Vol. 3. — P. 322 — 382.
80. Billoo A. G. Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in management and prevention of diarrhea [Electronic resource] // World J. Gastroenterol. — 2006. — Vol. 12, No 28. — P. 4557 — 4560. <http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/4557.pdf>
81. Chou K. M. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods // J. Onio, — 1995. — № 7. — C. 25 — 34.
82. Chralampopoulos D., Rastall R. A. Preotics and Probiotics Science and Technology.— UK.: Springer, 2009. — 1265 p.
83. Clark P. A., Martin J. H. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods // III- Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines Cult. — 1994. —№ 5. — P. 4852.
84. Davani-Davari D., Negahdaripour M., Karimzadeh I. et al. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms and Clinical Applications: Review // [Foods](#). — 2019. — V. 8 (3). — P. 1 — 27. doi: [10.3390/foods8030092](https://doi.org/10.3390/foods8030092)
85. Ducle H., Hong H. A. et al. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use // Appl. and Environ. Microbiol. — 2004. — Vol. 70, No 4. — P. 2161 — 2171.
86. Fusek J., Rodrigo L., Kruzliak P. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view // Nutrition and Metabolism. — 2016. — Vol. 13. — P. 1 — 13. doi:10.1186/s12986-016-0067-0
87. Gomez Quintero D. F., Kok C. R., Hutkins R. The Future of Synbiotics: Rational Formulation and Design: Mini review // Front. Microbiol. — 2022. — V. 13. — P. 1 — 9.
88. Haukioja A. Probiotics and Oral Health // Eur J Dent. — 2010. — № 4 (3). — P. 348 — 355.
89. [Kechagia](#) M., Basoulis D., Konstantopoulou S. et al. Health Benefits of Probiotics: A Review // [SRN Nutr.](#) — 2013. — 2013. — P. 481 — 651. doi: [10.5402/2013/481651](https://doi.org/10.5402/2013/481651)
90. Kobyliak N., Conte C., Cammarota G., Haley A.P., Styriak I., Gaspar L., Fusek J., Rodrigo L., Kruzliak P. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view // Nutrition and Metabolism. — 2016. — Vol. 13. — P. 1–13. doi:10.1186/s12986-016-0067-0
91. Kwoji I.D., Aiyegoro O.A., Okpeku M., Adeleke M.A. Multi-strain probiotics: synergy among isolates enhances biological activities // Biology. — 2021. — Vol. 10. — P. 1–20. <https://doi.org/10.3390/biology10040322>
92. Lacroix C., Yidirim S. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality // Curr. Opin. Biotechnol. — 2007. — Vol.18. — P. 176— 183.
93. MacPherson C., Audy J., Mathieu O., Tompkins T.A. Multistrain Probiotic Modulation of Intestinal Epithelial Cells' Immune Response to a Double-Stranded RNA Ligand, Poly(I·C) // Applied and Environmental Microbiology. — 2014. — Vol. 80, No 5. — P. 1692 — 1700. <https://doi.org/10.1128/AEM.03411-13>.
94. Matamoros S., Gras-Leguen Ch., Le Vacon F. et al. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health // Trends in Vicrobiology. — 2013, - 21 (4). — P. 167 — 173.
95. Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation / World Health Organization. Food and Agriculture Organization of the United Nations. — Rome, 2006. — 56 p.

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		125

96. Saarela M., Mongensen G., Fonden R., Matto J., Mattila—Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties // J. Biotechnol. — 2000. — Vol.84. — № 3. — P. 197—215.

97. [Schöpping](#) M., [Gaspar](#) P., [Neves](#) A. R. Identifying the essential nutritional requirements of the probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium longum* through genome-scale modeling // [NPJ Syst Biol Appl.](#) — 2021. — Vol. 7. — P. 1 – 15.

98. Schrezenmeir J., de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2001. Vol. – 73 (2). – P. 361s – 364s. doi: <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.361s>

99. Soccol C. R., Vandenberghe L. P., Spier M. R. et al. The potential of probiotics: a review // Food. Technol. Biotechnol. – 2010. – Vol.48. – № 4. – P. 413 – 434.

100. Strashnova I.V., Yamborko G.V., Vasylieva N.Yu. Biological activity of lactobacilli from different ecological niches of the southern region of Ukraine // Мікробіологія і біотехнологія. – 2020. – No 1 (48). – С. 6–19. [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.1\(48\).200811](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.1(48).200811)

101. Sugawara T., Sawada D., Ishida Y. et al. Regulatory effect of paraprobiotic *Lactobacillus gasseri* CP2305 on gut environment and function // Microb. Ecol. Health Dis. – 2016. – No. 27. – P. 30259 – 30269.

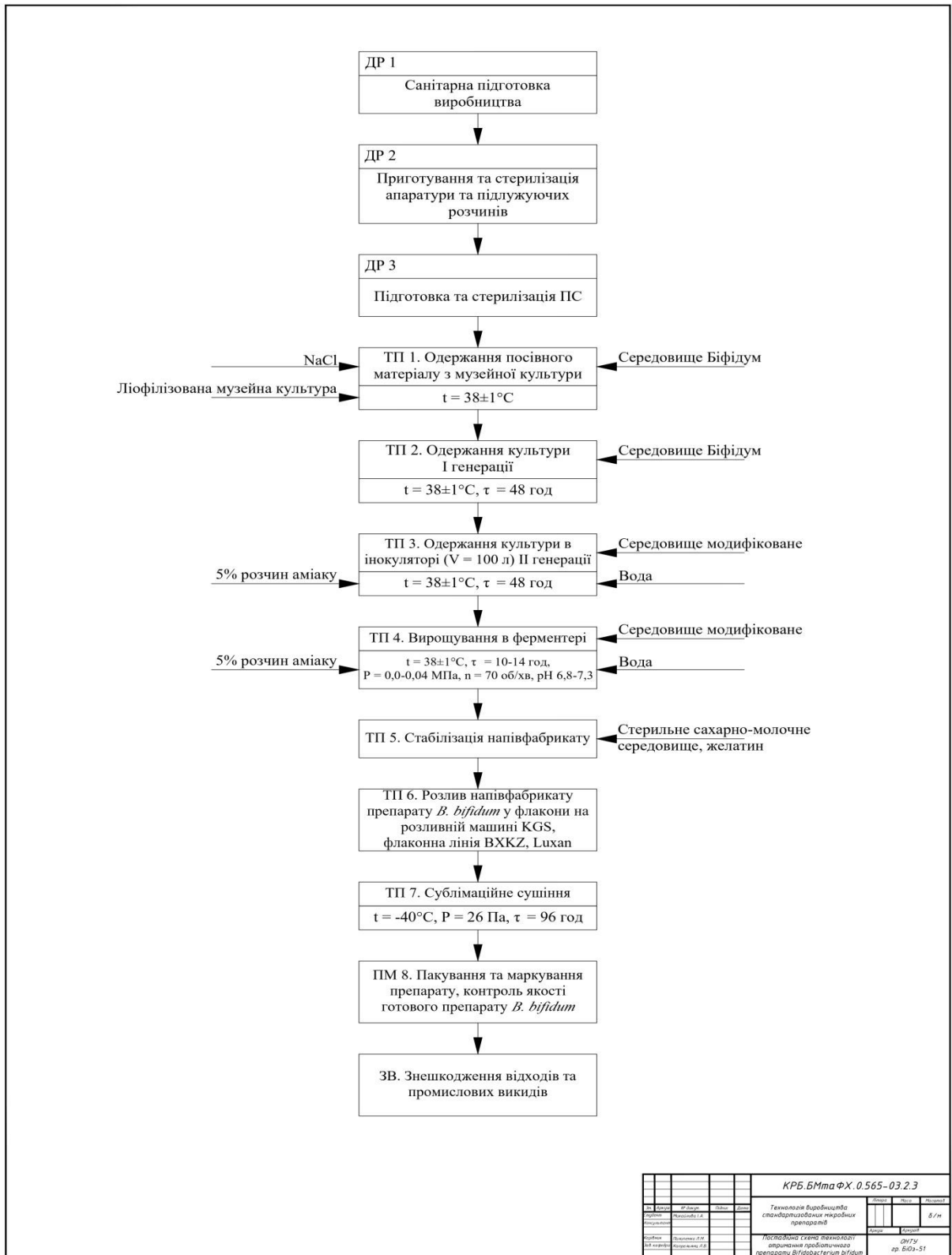
					КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3	Аркуш
Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата		126

ДОДАТКИ

					<i>КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3</i>	Аркуш
<i>Зм</i>	<i>Аркуш</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		<i>127</i>

Додаток А

Постадійна схема технології отримання пробіотичного препарату *Bifidobacterium bifidum*



					КРБ.БМтаФХ.0.565-03.2.3				
№	Дата	Відомості	Підпис	Печатка	Технологія виробництва стабілізованих неліофілізованих препаратів				
№	Дата	Відомості	Підпис	Печатка	Постадійна схема технології отримання пробіотичного препарату <i>Bifidobacterium bifidum</i>				
					Лист № 51				

Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата

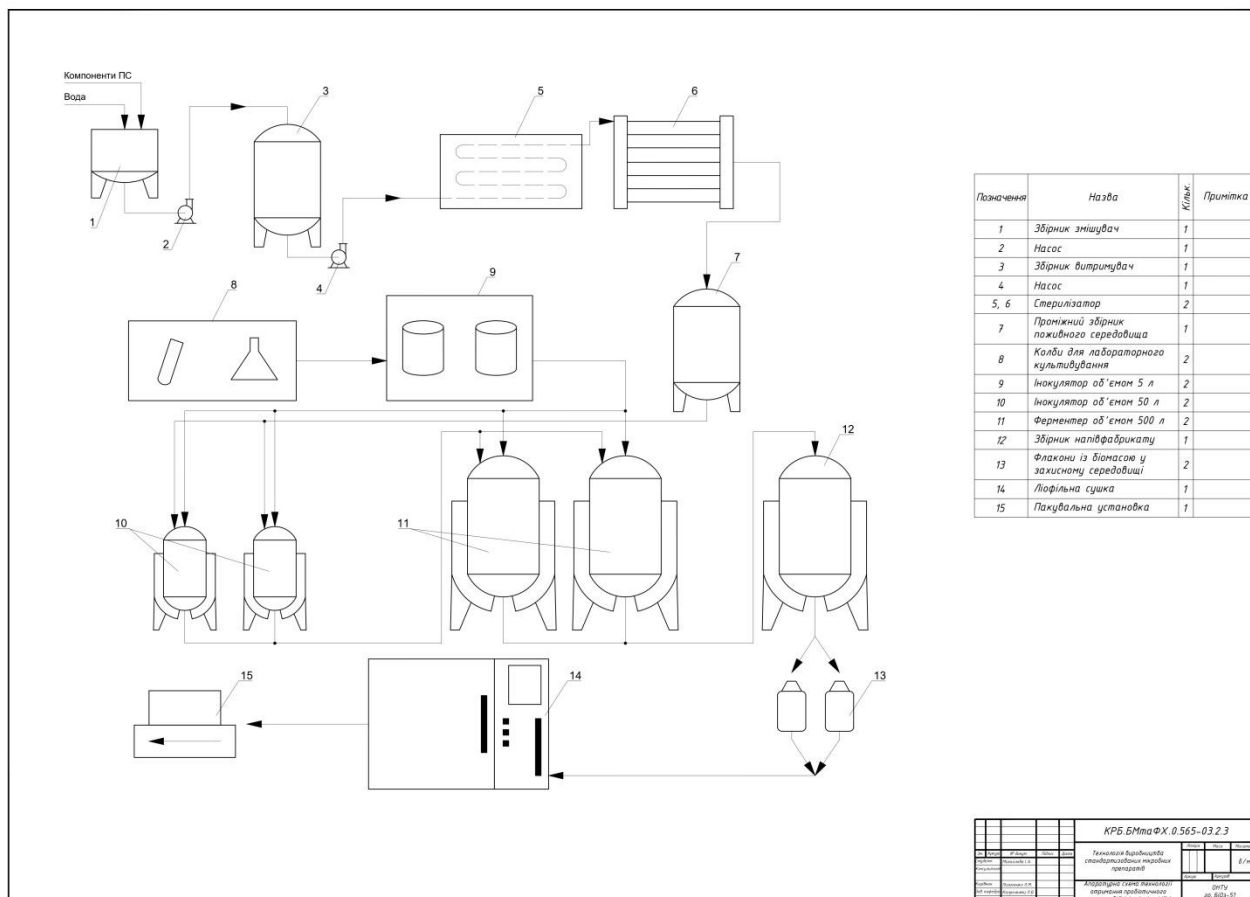
КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3

Аркуш

128

Додаток Б

Апаратурна схема технології отримання пробіотичного препарату *Bifidobacterium bifidum*



КРБ.БМтаФХ.0.565-03.2.3			
№ докум.	Дата	Версія	Статус
Технічна документація на фармацевтичні препарати			
Корпоративна інформація фармацевтичної компанії			
Лист № 03-01			

Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата					

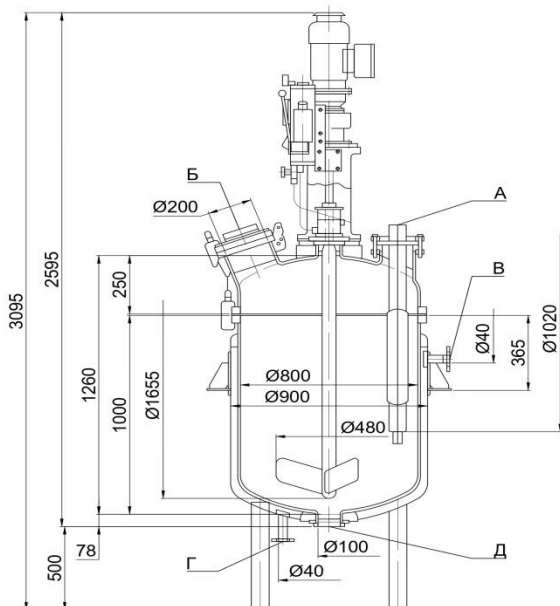
КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3

Аркуш

129

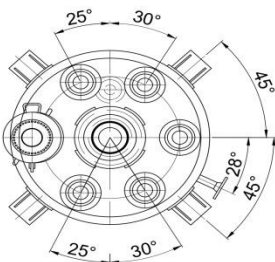
Додаток В

Ферментер у розрізі



Технічні характеристики:

Робочий об'єм апарата, м ³ :	0,535
Внутрішній діаметр оболонки, м:	0,9
Висота корпусу загальна, м:	3,095
Поверхня теплообміну, м ² :	2,5
Тип мішалки:	лопатевая
Частота обертання мішалки, об/хв:	30
Електропривод привода: потужність, кВт:	1,5



Позиція	Назва	Кільк.	Умовний прохід, мм
А	Вхід продукту	1	80
Б	Люк	1	200
В	Вхід теплоносія	1	40
Г	Вихід теплоносія	1	40
Д	Вихід продукту	1	100

				КРБ.БМтаФХ.0.565-03.2.3			
№	Категорія	Узгоджено	Підпис	Дата	Місце	Лист	Кількість
1	1						1/10
Технологія виробництва стандартизованих мікробіологічних препаратів				1/10			
Виробник: Біофарма (ІП)				Біореактор			
№1 у розрізі: Біореактор 0.565-03.2.3				ДНТУ ар. БІ03-51			

Зм	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата

КРБ.БМтаФХ.1.565-03.2.3

Аркуш

130

Додаток Д

НДРС. Апробація різних типів поживних середовищ для культивування мікроорганізмів *B.bifidum*

Порівняльна оцінка зростання *Bifidobacterium bifidum* на традиційних і запропонованих поживних середовищах

Час культивування, год	Кількість мікроорганізмів в процесі культивування, температура (37 ± 1) °С, Lg КУО/см ³ на поживних середовищах				
	запропоноване середовище з 4% рослинною добавкою	запропоноване середовище з 6% рослинною добавкою	запропоноване середовище з 8% рослинною добавкою	тіогліколове середовище	кукурудзяно-лактозне середовище (КЛС)
3	6,2	6,4	6,3	5,9	6,1
6	7,0	7,1	7,0	6,8	6,9
9	8,5	8,7	8,5	8,1	8,4
12	9,9	10,9	11,0	9,1	9,2
24	11,3	11,6	11,2	10,8	10,8
30	11,3	11,6	11,1	10,6	10,8

Антагоністична активність *Bifidobacterium bifidum*

Штам-пробіотик	Діаметр зони пригнічення росту, мм		
	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Bac. subtilis</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (БМтаФХ)	13,5	14,5	12,5