

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ КИЇВСЬКИЙ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій

Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

ДИПЛОМНИЙ БАКАЛАВРСЬКИЙ ПРОЄКТ

на тему: «Технологія отримання Колібактерину»

Виконала: студентка групи ББТ-19

Спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія

Олександра САВЧУК

Науковий керівник: к. т. н., доц. Ірина ВОЛОШИНА

Рецензент: к. б. н., доц. Ольга ШИДЛОВСЬКА

Київ 2023

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ТЕХНОЛОГІЙ ТА
ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра
Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія
Освітня програма Біотехнологія

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології, шкіри та хутра

д.т.н., проф. Олена

МОКРОУСОВА

« ___ » _____ 20__ р.

ЗАВДАННЯ

НА ДИПЛОМНИЙ БАКАЛАВРСЬКИЙ ПРОЄКТ СТУДЕНТУ

Савчук Олександрі Михайлівні

1. Тема дипломного бакалаврського проєкту:

Технологія отримання Колібактерину

Науковий керівник проєкту к.т.н., доц. Волошина Ірина Миколаївна,
затверджені наказом КНУТД від «08» листопада 2022 року № 224-уч.

2. Строк подання студентом дипломного проєкту _____

3. Вихідні дані дипломного проєкту: препарат колібактерин, *Echerihia coli*, наукова література, технологічна схема, обґрунтування технологічної схеми, методи контролю і характеристика біологічного агенту.

4. Зміст дипломного проєкту: техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва, характеристика біологічного агента, опис технологічної схеми, контроль якості цільового продукту, висновки, список використаних джерел

5. Дата видачі завдання _____.2023

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів дипломного бакалаврського проєкту	Терміни виконання етапів	Примітка про виконання
1	Вступ		
2	Розділ 1. Техніко-економічне обґрунтування		
3	Розділ 2. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва		
4	Розділ 3. Характеристика біологічного агента		
5	Розділ 4. Опис технологічної схеми		
6	Розділ 5. Контроль якості цільового продукту		
7	Висновки		
8	Оформлення дипломного бакалаврського проєкту		
9	Подання дипломного бакалаврського проєкту на кафедру для рецензування		
10	Перевірка дипломного бакалаврського проєкту на наявність ознак плагіату		
11	Подання дипломного бакалаврського проєкту на затвердження завідувачу кафедри		

Студент _____ Олександра САВЧУК

Науковий керівник _____ Ірина ВОЛОШИНА

Рецензент _____ Ольга ШИДЛОВСЬКА

АНОТАЦІЯ

**Олександра САВЧУК. Технологія отримання Колібактерину –
Рукопис.**

Дипломний бакалаврський проєкт за спеціальністю 162 Біотехнологія та інженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2023 рік.

Дипломний бакалаврський проєкт присвячено технології отримання пробіотику на основі *Escherichia coli* – Колібактерину.

У дипломному проєкті обґрунтовано технологію виробництва пробіотику Колібактерину на основі *Escherichia coli* Nissle 1917 L4 для лікування та профілактики неспецифічного виразкового коліту. Представлено технологічну схему виробництва Колібактерину, яка передбачає стадії допоміжних робіт та основного технологічного процесу – біосинтезу. Обґрунтовано вибір біологічного об'єкту, необхідні об'єми поживного середовища та умови його стерилізації. Обґрунтовано вибір ферментера для проведення біосинтезу, розраховано кількість та тривалість виробничих циклів.

Дипломний бакалаврський проєкт включає методи контролю стадій виробництва культуральної рідини, що містить *Escherichia coli*, які забезпечують відповідну якість препарату.

Ключові слова: пробіотик, Escherichia coli, неспецифічний виразковий коліт, біосинтез, контроль якості.

					ДБП.ПЗ.162.04		
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			
Розробив		Савчук О. М.			Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Волошина І. М.					
					АНОТАЦІЯ		
Н.Контр.							
Затвердив							
					КНУТД, ББТ-19		

ABSTRACT

Oleksandra SAVCHUK. Technology of obtaining Colibacterin - Manuscript.

Diploma bachelor's project in the specialty 162 Biotechnology and engineering. - Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2023.

The bachelor's diploma project is dedicated to the technology of obtaining a probiotic based on *Escherichia coli* - Kolibacterin.

The diploma project substantiates the production technology of the probiotic Kolibacterin based on *Escherichia coli* Nissle 1917 L4 for the treatment and prevention of non-specific ulcerative colitis. The technological scheme of the production of Colibacterin is presented, which includes the stages of auxiliary work and the main technological process - biosynthesis. The selection of the biological object, the necessary volumes of the nutrient medium and the conditions of its sterilization are substantiated. The choice of a fermenter for biosynthesis is justified, the number and duration of production cycles are calculated.

The bachelor's degree project includes methods of controlling the stages of production of culture fluid containing *Escherichia coli*, which ensure the appropriate quality of the drug.

Key words: probiotic, Escherichia coli, nonspecific ulcerative colitis, biosynthesis, quality control.

					ДБП.ПЗ.162.04		
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			
Розробив	Савчук О. М.				Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив	Волошина І. М.				Д	5	1
					КНУТД, ББТ-19		
Н.Контр.							
Затвердив					ABSTRACT		

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1	11
ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	11
1.1 Характеристика цільового продукту.....	11
1.2. Потреба у цільовому продукті	11
1.3. Розрахунок потужності виробництва	12
1.3.1. Розрахунок кількості пробіотику для забезпечення лікування хронічних колітів.....	12
1.3.2. Розрахунок потужності виробництва пробіотика <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 L4.....	14
1.4. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної (замовленої) потреби в цільовому продукті та геометричний об'єм ферментера.....	15
РОЗДІЛ 2	17
ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА	17
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища	17
2.1.1. Обґрунтування вибору біологічного агента	17
2.1.2. Обґрунтування вибору поживного середовища	21
2.2.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	28
2.2.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	30
2.2.3.1. Миючі засоби.....	31
2.2.3.2. Підбір концентрації миючих засобів	32
2.2.3.3. Обґрунтування вибору миючого засобу для обладнання	32
2.2.3.4. Дезинфікуючі засоби	34
2.2.3.5. Обґрунтування вибору методу дезінфекції	34
2.2.3.6. Обґрунтування вибору способу дезінфекції	35
2.3 Розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу.	37

					ДБП.ПЗ.162.04			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив		Савчук О. М.			ЗМІСТ	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Волошина І. М.				Д	6	2
Н.Контр.					КНУТД, ББТ-19			
Затвердив								

2.3.1. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріал	37
2.3.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 5 л.....	38
2.3.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці	38
2.4 Обґрунтування способу приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу.....	39
2.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	39
РОЗДІЛ 3	44
ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	44
3.1. Таксономічний статус.....	44
3.2. Морфолого-культуральні властивості	44
3.3. Фізіолого-біохімічні ознаки	46
РОЗДІЛ 4	47
ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	47
4.2. Опис технологічної схеми.....	47
РОЗДІЛ 5	61
КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	61
5.1 Методики контролю на стадії біосинтезу	61
5.2 Методи контролю цільового продукту	62
ВИСНОВКИ.....	68
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	70
ДОДАТКИ.....	75

ВСТУП

Актуальність теми. Неспецифічний виразковий коліт є одним з найбільш поширених запальних захворювань товстої кишки, який супроводжується болем у животі, кровотечею та зміною калових мас. Лікування такого захворювання зазвичай включає в себе прийом антибіотиків та протизапальних препаратів. Однак, у настанні останніх років все більше досліджень показують ефективність використання пробіотиків у лікуванні неспецифічного виразкового коліту. Важливе місце посідають пробіотики на основі кишкової палички (*Escherihia coli*), які сприяють зменшенню запалення, підвищенню імунітету, відновленню правильного балансу мікрофлори у товстій кишці та здатні зменшити симптоми хвороби.

Метою дослідження розробити технологію отримання пробіотику Колібактерину на основі *Escherihia coli*.

Завданнями дослідження є:

- проаналізувати статистику захворювань на неспецифічний виразковий коліт, визначити кількість потенційних споживачів та розрахувати потужності виробництва;
- здійснити огляд та аналіз наукової літератури щодо шляхів удосконалення пробіотиків на основі *E. coli*;
- обрати поживне середовище спираючись на його економічну доцільність та продуктивність;
- обґрунтувати необхідні стадії технологічного процесу;
- описати допоміжні стадії та стадії технологічного процесу отримання культуральної рідини;
- зазначити методи контролю якості під час та після біосинтезу.

Об'єкт дослідження – бактерії *Escherihia coli*.

					ДБП.ПЗ.162.04		
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			
Розробив		Савчук О. М.			Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Волошина І. М.			Д	8	3
					ВСТУП КНУТД, ББТ-19		
Н.Контр.							
Затвердив							

Предмет дослідження – розробка технології пробіотика Колібактерину на основі нового штаму кишкової палички для лікування неспецифічного виразкового коліту.

Методи дослідження – огляд та аналіз наукових статей, статистики захворювань, перегляд доступної інформації щодо пробіотиків на основі кишкової палички та оцінювання їх перспективності у лікуванні симптомів, які характерні для неспецифічного виразкового коліту.

Інформаційна база дослідження – наукові публікації, методички та навчальні посібники по темі Проектування та обладнання, інтернет ресурси щодо інформації наявних пробіотиків, захворювань.

Новизна проекту полягає у використанні нового пробіотичного штаму *Escherichia coli* Nissle 1917 L4, створеного шляхом генної модифікації, яка дозволяє бактерії синтезувати речовину (R)- β -гідроксибутират, яка полегшує симптоми хронічної хвороби та зменшує біль [14].

Практичне значення одержаних результатів – обґрунтувати необхідні стадії підготовчих робіт та основного технологічного процесу. Описати підготовчі стадії технології отримання Колібактерину для отримання колівмісного пробіотику.

Апробацію наукових результатів проведено через їх оприлюднення на конференціях міжнародного рівня: II Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції, що відбулась у Національному Фармацевтичному університеті, м. Харків, 20 травня 2022 року, Міжнародній науковій конференції «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування», що відбулась у Державному Біотехнологічному університеті, м. Харків, 27-28 квітня 2023 р. (Додаток А).

Публікації. Результати досліджень опубліковано в трьох збірниках матеріалів міжнародних науково-практичних конференцій.

						ДБП.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			9

Бібліографія опублікованих робіт включає:

1. **Савчук О.М.,** Волошина І.М. Біогенний синтез наносрібла молочнокислими бактеріями // **Матеріали Міжнар. наук. конф. «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування», 27-28 квітня 2023 р. / Держ. біотехнол. ун-т. – Х., 2023, (додаток А)**
2. **Савчук О.М.,** Маліношевська М.О., Шидловська О.А. Деякі аспекти властивостей наночасток срібла, отриманих зеленим синтезом // **Матеріали II міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології», 2022. С. 221-223 (додаток Б)**
3. **Савчук О.М.,** Лупан К.О., Волошина І.М. Вплив наночастинок срібла на організм людини //
4. **матеріали II міжнародної наук.-практ. інтернет-конф. «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (20 травня 2022 р., м. Харків) (додаток В)**

						Аркуш
						10
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

1.1 Характеристика цільового продукту

Пробіотики на основі життєздатних бактерій кишкової палички *Escherichia coli* призначені для відновлення мікрофлори кишечника. Найчастіше використовуються штами *Escherichia coli*, які володіють антагоністичними властивостями до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Дані препарати являють собою порошок жовтого кольору різної інтенсивності, який є ліофільно висушеною біомасою живих клітин кишкової палички у середовищі культивування. Можуть випускатись у формі капсул, суспензій та порошку (у флаконах). Призначені для перорального вживання згідно з інструкцією та характеризуються специфічним запахом та смаком. Застосування даних пробіотиків не викликає побічних реакцій та дозволене для використання з 6-ти місячного віку. За АТС класифікацією пробіотики на основі *Escherichia coli* відносяться до антидіарейних мікробних препаратів (A07FA10).

1.2 Потреба у цільовому продукті

Пробіотики на основі кишкової палички застосовуються для лікування дисбактеріозу, як антидіарейний препарат. За статистикою останніх років в Україні до 80% населення хворіють на дисбактеріоз – зміну кількісного складу мікроорганізмів, які заселяють організм людини. Дисбактеріоз може проявлятися як нудота, діарея, здуття живота, бурчання та інші симптоми. На баланс та співвідношення нашої мікрофлори впливає переважно наш раціон харчування та спосіб життя, тому більшість людей можуть контролювати цей процес самостійно, без прийому таких лікувальних препаратів як пробіотики. Проте певний відсоток людей потребує прийом пробіотиків для відновлення

					ДБП.ПЗ.162.04			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив		Савчук О. М.			РОЗДІЛ 1 ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Волошина І. М.				Д	11	5
Н.Контр.					КНУТД, ББТ-19			
Затвердив								

правильного балансу. Одними із таких препаратів є пробіотики на основі *Escherichia coli*, що містять кишкову паличку, яка здатна пригнічувати надлишкову дільність патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, таким чином відновлюючи здоровий баланс мікробіому. По такому принципу працюють усі пробіотики, тому завдяки своїм властивостям вони випускаються у великій варіативності препаратів. Наприклад, до препаратів на основі кишкової палички належать: Колібактерин, Біфікол, Мутафлор, Хілак Форте, Постеризан, Постеризан Форте, Симбіофлор 2, Про-Симбіофлор [1].

Дані пробіотики застосовуються переважно при хронічних колітах та дисбалансі кишкової палички у кишківнику.

1.3 Розрахунок потужності виробництва

1.3.1 Розрахунок кількості пробіотику для забезпечення лікування хронічних колітів

Станом на 1 лютого 2022 року населення України складало 40 960 795 осіб. За оцінками ООН у справах біженців з початку повномасштабної війни 24.02.2022 закордон виїхало 11,1 млн українців, проте станом на 24 серпня 2022 року 4,7 мільйонів громадян уже повернулись до України, тому приблизна кількість населення України зараз складає 33,7 млн осіб [2].

Станом на травень 2021 року підтверджена кількість хворих в Україні на хронічне запалення кишківника – виразковий коліт становить понад 11 тисяч осіб, проте реальна кількість хворих може бути в рази вищою, адже хвороби часто протікають приховано [3].

Серед людей які страждають на виразковий коліт є діти, які складають 15-20% від усіх пацієнтів [4].

Оскільки на ринку пробіотичних антидіарейних ліків та БАДів в Україні присутні препарати на основі різних мікроорганізмів, а саме біфідобактерій, лактобактерій, кишкових паличок, бактерій *Lactococcus*,

						Аркуш
						12
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Streptococcus thermophilus, пропіоновокислих бактерій, сахароміцетів типу *Saccharomyces*

boulardii та інших [5], то можливість використання пробіотиків на основі кишкової палички для лікування колітів складає приблизно 10% хворих.

Розрахуємо кількість хворих, які будуть лікуватись даними пробіотиками:

1. Кількість усіх хворих в Україні на період війни: (11 тис. × 33,7 млн.) / 40,1 млн = 9 245 осіб.

2. 10% хворих, які будуть вживати пробіотики на основі кишкової палички: (9 245 ос. × 10%) / 100% = 925 осіб.

Розглянемо дозування найпершого та найефективнішого препарату Мутафлор:

Стандартна доза препарату для дорослих і підлітків складає: з першого по четвертий день прийому – по 1 капсулі препарату МУТАФЛОР на день, далі – по 2 капсули препарату МУТАФЛОР на день. Для підтримання стану ремісії при виразковому коліті, мутафлор рекомендують пити безперервно – 12 місяців на рік. Одна капсула містить *Escherichia coli* штам Nissle 1917 – 2,5 – 25x10⁹ живих бактеріальних клітин (колонієутворювальних одиниць, КУО). Даний пробіотик рекомендують вживати дітям, які старше 15-ти років [6]. За статистикою, діти до 14 років складають близько 15% хворих на неспецифічний виразковий коліт, тому кількість осіб, які будуть лікуватись цим препаратом зменшується із 925 до 787 хворих.

Середня кількість доз у рік складає 708 (356 днів × 2 капсули - 4), помножимо це на кількість хворих, які будуть вживати цей пробіотик: 708×787 = 557,2 тис. доз / рік.

Оскільки на ринку України препарат Мутафлор імпортований, то наш продукт буде займати 50% ринку, тому нам необхідно виробляти (557,2 тис. доз × 50%) / 100% = 278,6 тис. доз / рік.

						Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		13

Розрахуємо кількість біомаси, необхідної для забезпечення 278,6 тис. доз препарату. Одна разова доза це одна капсула, яка містить від $2,5 \times 10^9$ КУО.

ДБП.ПЗ.162.04

При забезпечені оптимальних умов культивування обраний штам кишкової палички на середовищі LB дає 10^9 КУО в 1 мл. Тобто для забезпечення однієї дози препарату потрібно від 2,5 мл культуральної рідини. Оскільки кількість КУО в дозі може бути більшою, то для зручності обрахунків візьмемо 3 мл культуральної рідини для однієї дози препарату.

Тоді, одна доза складає 3 мл, тому $278,6 \text{ тис. доз} \times 3 \text{ мл} = 835,8 \text{ тис. мл} = 835,8 \text{ л.}$

Отже, щоб забезпечити жителів України ефективним препаратом на основі кишкової палички на цілий рік, необхідно виготовити 557,2 тисяч доз ($557,2 \text{ тис. доз} \times 3 \text{ мл} = 1671,6 \text{ л живої біомаси}$). Але оскільки в Україні вже широко застосовується імпортований препарат, то ми хочемо заповнити 50% ринку і будемо вирощувати 835,8 л кишкової палички.

1.3.2 Розрахунок потужності виробництва пробіотика *Escherichia coli* Nissle 1917 L4

Оскільки усі пробіотики на основі *E.coli* є ліофільновисушеною біомасою кишкової палички, то маса необхідної біомаси за розрахунками складає 835,8 л.

Об'єм культуральної рідини, необхідний для отримання 278,6 л біомаси *Escherichia coli* Nissle 1917 L4 складає 278,6 л.

Врахуємо можливі втрати біомаси на виробництві – 20%:

$$835,8 \text{ л} / (100\% - 20\%) \times 100\% = 1044,75 \text{ л.}$$

						Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		14

1.4 Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної (замовленої) потреби в цільовому продукті та геометричний об'єм ферментера.

У пункті 1.3.2. ми розраховали кількість необхідної культуральної рідини ($V_{кр}$).

Ми плануємо виробляти річну норму нашого препарату за квартал, що складає 91 робочих днів ($T_{рд}$) при щоденній роботі, тоді об'єм продукту на добу ($V_{д}$) складатиме:

$$V_{д} = V_{кр} / T_{рд} = 1044,75 \text{ л} / 91 \text{ днів} \approx 11,48 \text{ л.}$$

Визначимо кількість виробничих циклів у рік. Для цього нам потрібно розрахувати цикл роботи ферментера ($T_{цф}$): мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 48 год, – сумарний час складає 54 години.

$$N_{ц/рік} = V_{кр} / ((V_{д} \times T_{цф}) / 24) = 1044,75 / ((11,48 \times 54 \text{ години}) / 24) = 1044,75 / 25,83 = 40,45 = 41 \text{ цикл.}$$

Далі визначимо кількість культуральної рідини, яка необхідна для одного циклу ($V_{кр/ц}$):

$$V_{кр/ц} = K_{запасу} \times V_{д} \times T_{цф} / 24 = 1,1 \times 11,48 \times 54 / 24 \approx 28,5 \text{ л,}$$

де $K_{запасу}$ – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій.

Розрахуємо необхідний об'єм ферментера для отримання 28,5 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення ($K_{зап}$) 0,6:

$$V_{г} = V_{кр/ц} / K_{зап} = 28,5 / 0,6 = 47,5 \text{ л.}$$

					Аркуш
					15
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата	

Отже, геометричний об'єм ферментера для отримання 28,5 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення ($K_{\text{зап}}$) 0,6 має становити 47,5 л, візьмемо найближчий за об'ємом ферментер 50 л.

ДБП.ПЗ.162.04

РОЗДІЛ 2
ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ
ВИРОБНИЦТВА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища

2.1.1 Обґрунтування вибору біологічного агента

Колібактерин, Мутафлор, Симбіфлор-2, Біфікол – пробіотичні препарати, продуцентом яких є різні штами *Escherichia coli*.

Почнемо розгляд з найбільш вивченого - зі штаму *Escherichia coli* Nissle 1917. Це непатогенний штам, виділений із фекалій солдата, у якого не розвинулась інфекційна діарея в часи серйозного спалаху дизентерії у 1917 році під час Першої світової війни. Альфред Ніссле – професор, який виділив даний штам та зробив на його основі пробіотичний препарат, який доводить свою ефективність уже більше сотні років на території Європи, Канади та Австралії [7].

З часом, було доведено, що даний штам ефективно використовувати для лікування запалень кишечника, гострої діареї та здатен зменшувати кишкову проникність [8].

Численні дослідження показують, що *Escherichia coli* Nissle 1917 покращує бар'єрну функцію, стимулює вироблення антимікробних пептидів і посилює імунну відповідь у тканинах господаря. Вона може виділяти низку антимікробних молекул і ферментів, включаючи сидерофори, що поглинають іони заліза, бактерицидні мікроцини та протеази, що дозволяє цьому пробіотичному штаму конкурувати з іншими патогенними штамми *E. coli*, а також із спорідненими Enterobacteriaceae – та попереджувати утворення біоплівки [9].

					ДБП.ПЗ.162.04			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив		Савчук О. М.			РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Волошина І. М.				Д	16	26
Н.Контр.					КНУТД, ББТ-19			
Затвердив								

Крім того, універсальний пробіотик на основі *Escherichia coli* Nissle 1917 має здатність регресувати ракові пухлини, що означає, що препарати на основі даного штаму можна використовувати для додаткових клінічних застосувань [10].

Були проведені кілька порівняльних досліджень підтримки стану ремісії пробіотика на основі біомаси *Escherichia coli* Nissle 1917 та меласазину (препарат для лікування ЗЗК, в тому числі, виразкового коліту та хвороби Крона) на великих групах людей з запальним захворюванням кишечника – виразковим колітом. Результати досліджень стверджують, що даний пробіотик є єдиним лікарським препаратом, який підтримує ремісію у пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом (НВК) [11].

Ще одним пробіотичним штамом є *Escherichia coli* DSM17252, який використовується для німецького пробіотика Symbioflor-2, який містить живі клітини кишкової палички та її автолізат [12].

Дослідження впливу даного препарату на людей з синдромом подразненого кишечника (СПК) у порівнянні з плацебо показує його ефективність у зменшенні типових проявів захворювання (18,9%) порівняно з плацебо (6,67%) [13].

Різноманітні властивості *Escherichia coli* Nissle 1917 включають не тільки адгезію та антагоністичну дію на патогени, але також зручні генетичні маніпуляції та ріст в аеробних, мікроаеробних та анаеробних умовах. Удосконалення штаму *Escherichia coli* Nissle 1917 для лікування колітів можливе за допомогою сконструйованої плазмід (донор *E. coli* S17-1.), яка зможе синтезувати 3-гідроксибутират (ЗНВ), який слід утримувати на високому рівні для надання терапевтичного ефекту у лікуванні колітів. Щоб запобігти горизонтальному переносу генів і уникнути використання антибіотиків для підтримки стабільності плазмід, вчені вставили весь шлях синтезу

3-гідроксибутирату в бактеріальний геном для застосувань *in vivo*.

						Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		17

ДБП/БЗ/162/04

(R)- β -гідроксибутират (ЗНВ) є основним компонентом кетонових тіл тварин, що служить джерелом енергії під час голодування або фізичних вправ. Незважаючи на свою функцію в постачанні енергії, ЗНВ також розглядається як терапевтичний засіб. Повідомлялося про сприятливий ефект ЗНВ при лікуванні судом, гіпертонії, NLRP3-опосередкованого запалення або нейродегенеративних захворювань. Крім того, після введення ЗНВ у мишей також спостерігалось стимулювання формування кісткової тканини, поліпшення навчання та пам'яті та захист гліальних клітин.

Дослідження було проведено на основі кількох сконструйованих штамів – EcNL3, EcNL4, EcNL5 і EcNL6, EcNL7, EcNL8, EcNL9, EcNL10. Серед них найкращі результати показав EcNL4 – він може виробляти 0,5 г/л ЗНВ в умовах анаеробної та мікроаеробної ферментації на визначених середовищах M9, що є найвищим значенням серед кандидатів. Генетичні модифікації штаму ніяк не змінили пробіотичні властивості вихідного штаму *Escherichia coli* Nissle 1917, навіть більше, лабораторні дослідження на мишах показують збагачення пробіотичних ефектів, а саме підвищення кількості інших пробіотичних штамів (*Akkermansia* spp. – збільшення до 31%), підвищених рівнів SCFA (короткі ланцюги жирних кислот - попереджають пухлинну трансформацію колоноцитів, беруть участь у доставленні субстратів ліпо — і глюконеогенезу, регулюють функцію детоксикації печінки, впливають на рівень деяких гормонів гіпофізу), у просвіті кишечника та полегшення ознак коліту.

Більше того, молекули, які вивільняються бактеріями цього штаму мають численні переваги над звичайними ліками:

- застосування бактерій, які вирощені на біосубстанціях, можуть виробляти терапевтичні агенти, є економічно ефективними та забезпечують вивільнення ліків.

						Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		18

- терапевтичні та пробіотичні бактерії мають мало побічних ефектів, оскільки вони переважно колонізують мішені.
- метод може бути більш ефективним, ніж традиційна доставка ліків щодо точності, тривалості та контролю, особливо в товстій кишці.

Це дослідження забезпечило регулярне дозування 100 мг/кг 3-гідроксибутирату мишам при щоденному пероральному прийомі [14].

Також для виробництва пробіотиків (Колібактерин, Біфікол) використовують штам *Escherichia coli* M-17, який є похідним *Escherichia coli* Nissle 1917. Проте *Escherichia coli* M-17 має нижчу антагоністичну активність щодо бактерій кишкової групи, внаслідок втрати здатності до синтезу коліцину В, та має підвищену чутливість до антибіотиків. Цей штам має небажаний адгезивний фенотип, а саме високоадгезивний M^H фенотипу фімбрії 1-го типу.

Першим сконструйованим штамом для цієї мети був штам *Escherichia coli* / pColar VKPM B-7446, отриманий шляхом введення некон'югативної плазмиди pColar до початкового штаму-продуцента. Гібридна плазміда pColar сконструйована з детально вивченої плазмиди ColE1, яка отриманна з непотагеного штаму кишкової палички. Початкова плазміда ColE1 має у своїй структурі mob-область, завдяки якій вона здатна до мобілізації в інші клітини за допомогою кон'югативних плазмід – що може призводити до небажаних результатів. Тому плазміда pColar утворена шляхом вирізання mob-області з плазмиди ColE1 та внесенням фрагменту, що містить ген b1a, отриманий з відомого вектора pUC19, який кодує синтез β-лактамази. Таким чином, отримана гібридна плазміда pColar не може передаватись в інші бактеріальні клітини. Вона містить у собі гени продукції коліцину E1 і детермінант стійкості до антибіотику пеніцилінового ряду – ампіциліну у дозах до 150мг/л.

						Аркуш
						19
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

В результаті, штам *Escherichia coli* / pColap VKPM B-7446 має підвищену стійкість до антибіотиків та здатність до синтезу коліцину E1 у порівнянні з вихідним штамом, тому можна зробити висновок, що плазміда

pColap несе необхідні для нас властивості. Неодолком цього штаму є невирішена проблема небажаного адгезивного фенотипу.

У ході досліджень штаму *Escherichia coli* M-17 виявлено, що активність гену fimH дає той самий небажаний адгезивний фенотип, адже він регулює клітинні пілі та фімбрії 1-го типу [15].

Отже, найбільш перспективним штамом кишкової палички для лікування котилів є *Escherichia coli* Nissle 1917 L4, тому що його попередник *Escherichia coli* Nissle 1917 є попередником інших пробіотичних штамів, які втратили цінні властивості, наприклад, *Escherichia coli* M-17. А от новий штам EcNL4 окрім збереження усіх пробіотичних властивостей, має здатність до синтезу 3-гідроксибутирату, який значно полегшує симптоми колітів, та здатен впливати на розвиток інших штамів пробіотичних бактерій у кишківнику. Лабораторні дослідження доводять його ефективність, користь та відсутність негативного впливу чи горизонтального переносу генів.

2.1.2 Обґрунтування вибору поживного середовища

Розглянемо середовища, які призначені для рясного росту різних штамів кишкової палички *Escherichia coli*, та розрахуємо їх вартість.

Розрахунок вартості поживних середовищ для вирощування *Escherichia coli* наведено в табл. 2.1.

						Аркуш
						20
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

**Обґрунтування вибору поживного середовища для вирощування
E. coli L4**

№	Складові середовища	Кількість компонента, г/л	Вартість компонента, грн/кг	Вартість компонента на поживне середовище, грн×г/л	Джерела
1	2	3	4	5	6
Середовище LB					
1	Триптон	10	5576,26 грн/500г	111,52	1
2	Дріжджовий екстракт	5	14	0,07	2
3	Na ₂ HPO ₄	6	450	2,7	3
4	KH ₂ PO ₄	3	190	0,57	4
5	NH ₄ Cl	1	110	0,11	5
6	NaCl	0,5	80	0,04	6
7	1М MgSO ₄	2 мл	20,4	0,04	7
8	CaCl ₂	0,1	35	0,0035	8
9	Глюкоза	10	67	0,67	9
10	Вода очищена	1 л	1,5	1,5	14
Вартість 1 л середовища = 117,2 гривень.					
Казеїновий бульйон					
1	Пептон	15	1060	15,9	10
2	KH ₂ PO ₄	0,5	190	0,075	4
3	NaH ₂ PO ₄	0,5	128	0,064	11
4	NaCl	0,5	80	0,04	6
5	Казеїновий гідролізат	600	1 380 грн/1,5кг	552	12
6	Дріжджовий автолізат	200	797	159,4	13
7	Вода очищена	1 л	1,5	1,5	14
Вартість 1 л середовища = 729 гривні.					

1	2	3	4	5	6
Казеїново-дріжджове середовище					
1	Дріжджовий автолізат	25	797	20	13
2	Панкреатичний гідролізат казеїну	21	7 050 грн/500 г	296	15
3	Вода очищена	1 л	1,5	1,5	14
Вартість 1 л середовища = 317,5 гривні.					
Триптон соєвий бульон (TSB)					
1	Соєвий пептон	3	250	0,075	16
2	Панкреатичний гідролізат казеїну	17	7 050 грн/500 г	239,7	15
3	NaCl	5	80	0,4	6
4	Глюкоза моногідрат	2,5	65	0,1625	17
5	Гідрофосфат калію	2,5	150	0,375	18
6	Вода очищена	1 л	1,5	1,5	14
Вартість 1 л середовища = 242,2 гривні.					

Джерела:

1. <https://prom.ua/ua/p1310539109-pepton-tripton-dmikrobiologii.html>
2. <https://prom.ua/ua/p1310539109-pepton-tripton-dmikrobiologii.html>
3. <https://vlemiko.com.ua/ua/p1237461796-natrij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>
4. <https://prom.ua/ua/p1091383043-monofosfat-kaliya-kalij.html?&primelead=My44OTk5OTk5>
5. <https://himreagent.com.ua/ua/p1090663782-ammonij-hloristyj-hlorid.html>
6. https://www.covalent.com.ua/ru/shop/sodium_chloride/
7. <https://www.systopt.com.ua/ru/item-magnij-sirchanokyslyj-7-vodnyj-sulfat-magniyu>
8. <https://prom.ua/ua/p1651355368-hlorid-kaltsiyu-kaltsij.html?&primelead=MS42>
9. <https://prom.ua/ua/p1684529697-glyukoza-pischevaya-kristallicheskaya.html>
10. <https://labormarket.com.ua/p1122819431-pepton->

fermentativnyj.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=18377885026&utm_network=x&utm_adposition=&utm_device=c&utm_matchtype=&utm_target=&utm_group=&utm_term=&gclid=CjwKC Ajw7p6aBhBiEiwA83fGuiMza-

11. <https://flagma.ua/natriy-fosfornokisly-1-zameshchenny-pishchevoy-o14111477.html>
12. <https://prom.ua/ua/p1354677320-izolyat-belka-gidrolizat.html>
13. <https://prom.ua/ua/p1426416969-pischevye-drozhdzi-neaktivnye.html>
14. <https://www.epravda.com.ua/publications/2021/01/13/669917/>
15. <https://shop.hlr.ua/ua/pepton-tripton-dmikrobiologii-pankreaticheskiy-gidrolizat-kazeina-500-g-233741.html>
16. <https://prom.ua/ua/p1647725094-izolirovannyj-soevyj-belok.html>
17. <https://proteinukiev.com.ua/ua/p50643831-glyukoza-monogidrat-1000.html>
18. <https://runainter.com.ua/p260995616-kalij-fosfornokislyj-zameshchennyj.html>

Отже, ми будемо використовувати поживне середовище LB для росту *Escherichia coli* Nissle 1917 L4, тому що це найбільш економічно вигідне середовище, і воно повністю забезпечує різні штами кишкової палички всіма нутрієнтами.

2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу

Спочатку потрібно визначити умови та параметри проведення процесу біосинтезу, які залежать від морфолого-культуральних властивостей штаму-продуцента та фізико-хімічних особливостей цільового продукту – пробіотика, що містить ліофільно висушену кишечну паличку.

Процес промислового культивування і накопичення біомаси кишкової палички відбувається за аеробних умов при температурі 37°C та кислотності від 6,8 до 7,2, тому необхідно забезпечити подачу стерильного повітря за допомогою барботера та турбінних мішалок.

Для максимального накопичення біомаси кишкової палички при врахуванні необхідної потужності виробництва та створення оптимальних

						Аркуш
						23
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

умов для її вирощування ми будемо використовувати періодичний глибинний спосіб

Отже, наш ферментер повинен бути оснащений барботером для надходження стисненого повітря у середовище культивування та датчиком рН для контролю кислотності, температури та тиску. Також нам необхідні мішалки для рівномірного розділення кисню по всьому об'єму поживного середовища та перемішування біомаси. Найкраще підійде турбінна мішалка, тому що вона є досить ефективною у перемішуванні рідин середньої в'язкості та рівномірному насиченні рідини повітрям та іншими газами. Відповідно до усіх умов біосинтезу ми обираємо турбінну мішалку відкритого типу, адже ми маємо невеликий об'єм культуральної рідини та невисоку динамічну в'язкість рідини, для якої підходить даний тип мішалок [16].

Тому, для забезпечення необхідних умов біосинтезу при виборі ферментера ми керуємось наступними чинниками:

- економічна доцільність;
- корозійна стійкість матеріалу – нержавіюча сталь;
- асептичні умови проведення ферментації, герметичність;
- наявність датчиків температури, тиску та кислотності для контролю показників протягом усього часу проведення ферментації;
- наявність дозаторів для введення води, компонентів поживного середовища;
- витримування високого тиску та температури стерилізації;
- легкість проведення ремонтних робіт та підготовки до роботи;
- робочий об'єм – 50 л, 5 л;
- компактність та мобільність.

Перед остаточним вибором ферментера ми розглянули декілька ферментерів, проаналізували та порівняли їх характеристики.

						Аркуш
						24
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Станом на сьогодні існує дуже багато фірм, які виробляють ферментери, серед них добре зарекомендували себе LAMBDA MINIFOR, Sartorius, B. Braun Biotech, DAS GIP, Applikon, Millipore, Bioengineering AG, ДБП.ПЗ.162.04, Broadley James, JSC та Chemar.

Для отримання пробіотика на основі кишкової палички необхідно обрати 2 ферментери на 5 та 50 л. Перший обраний ферментер – Biostat Cplus від Sartorius на 5 л із нержавіючої сталі. Він задовольняє усі наші запити та потреби та є найуспішнішим біореактором у своєму класі.



Рис. 2.1. Ферментер Sartorius Biostat Cplus (Фінляндія)

Функціональність даного ферментера досить велика – можна обирати спосіб роботи для стерилізації (парове нагрівання та електричне). Завдяки своїм невеликим розмірам ферментер має коліщата, що дозволяють переміщати його в будь-яке місце. Цей біореактор обладнаний найкращим контролером DCU, який дозволяє повністю контролювати процес через зрозумілий сенсорний екран, регулює основні параметри біосинтезу: температуру, рН, тиск, швидкість, перемішування, регулювання подачі кисню та інших газів, датчик піноутворення. Вдосконалено контролер DO, який дозволяє контролювати гравіметричні подачі, масові витрати, що

дозволяє використовувати складніші стратегії газоутворення, має вбудований аналізатор вихідних газів. Двигун мішалки керується автоматичними послідовностями для стерилізації, тому не потребує обслуговування та забезпечує безпечність. Даний ферментер оснащений датчиками для моніторингу загальної біомаси на основі ряду параметрів, для контролю рівня глюкози, насосами зі змінною швидкістю подавання субстрату та 2 інтегровані перистальтичні насоси через який ми можемо подавати луг та кислоту для балансування кислотності. Цей біореактор оснащений пляшечкою для відбору проб, системою газопостачання. Особливістю є модульність конструкції, що дозволяє конфігурувати систему згідно з нашими потребами та вимогами. Безредукторний мотор працює дуже тихо, практично без звуку – що дуже важливо для забезпечення нормальної роботи в лабораторному приміщенні.

Також Biostat Cplus можна використовувати для великої варіативності процесів – для розробки вакцин, антитіл, біопалива, ферментації з високою щільністю клітин та для нитчастих мікроорганізмів [17,18].

Оскільки, ферментери Biostat Cplus мають невеликий об'єм (максимальний 30 л), то основним ферментером ємністю на 50 л є Techfors від Infors (Швейцарія). Ферментери даного виробника володіють усіма необхідними датчиками для контролю за біосинтезом, а саме датчики: кислотності, температури, тиску, розчиненого кисню, оптичної щільності, контроль піноутворення. Ферментер має високопродуктивні насоси та надає можливість налаштовувати швидкість подачі газів та швидкість мішалки [19,20].

						Аркуш
						26
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		



Рис. 2.2. Ферментер Techfors, Infors (Швейцарія)

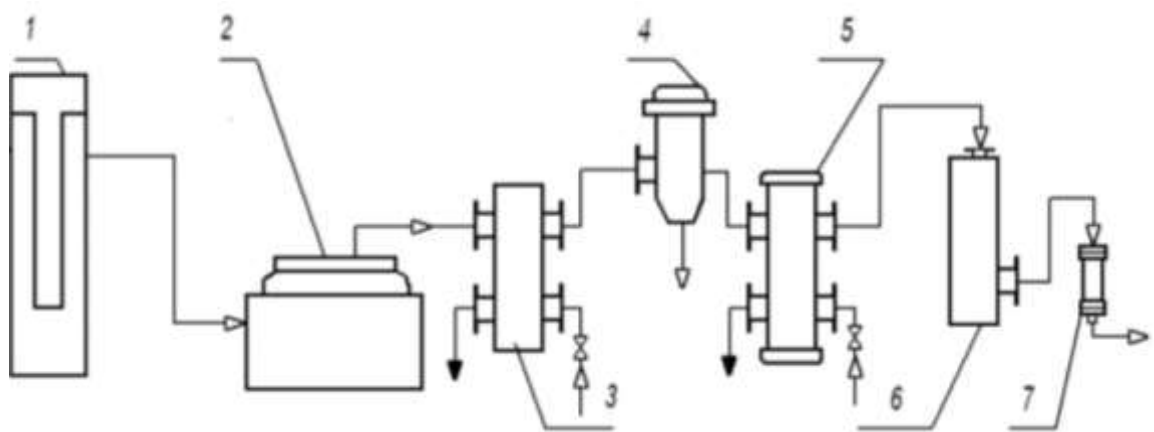
2.2.2 Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

EcNL4 є факультативним анаеробом, тобто може жити у аеробних та в анаеробних умовах. Аеробні умови культивування призначені для накопичення максимальної кількості біомаси – що нам і потрібно. Атмосферне повітря потрібно стерилізувати перед ферментацією, бо в ньому містяться спори мікроорганізмів, бактерії, бацили, гриби, пил, дрібнодисперсні частинки та пари води, які можуть призвести до контамінації середовища та культури.

Є кілька методів стерилізації повітря, а саме: за допомогою нагрівання або іонізуючого випромінювання (УФ - випромінювання), фільтрування. Перший метод є найбільш ефективним та надійним, але цей варіант не є економічно доцільним, бо на виробництвах затрачаються великі об'єми повітря. Тому великі підприємства надають перевагу стерилізації повітря методом фільтрування через спеціальні фільтри.

Один із методів очищення повітря базується на видаленні мікробів за допомогою різних пористих та волокнистих матеріалів. Нижче наведена ціла схема, яка здатна очистити повітря на 99,99%.

Для стерилізації повітря нам необхідні компресор, ресивер, теплообмінник, головний та індивідуальний фільтр. Спочатку атмосферне повітря проходить через спеціальний фільтр (1), який очищає повітря від різних механічних домішок, пилю, частинок розмірок 5-10 мкм. Ефективність очистки цими фільтрами складає 50-85% залежно від використаного фільтруючого матеріалу. Далі повітря надходить у компресор (2), де відбувається його стиснення, та як побічна реакція – нагрівання повітря. Гаряче повітря потрібно охолодити в теплообміннику (3), та позбутися конденсату у вологовловлювачі (4). На рис. 1 також зображений ресивер (5), який призначений для зберігання та згладжування пульсацій стисненого повітря. Далі повітря надходить у теплообмінник (6) для нагрівання повітря до температури ферментації та зменшення вологості, далі – проходить головний фільтр (7), який ще називають фільтром грубого бактеріального очищення. Він уловлює частинки розміром 1-1,5 мкм з ефективністю 98%. Найкращим матеріалом для даного типу фільтрів є базальтове волокно, яке не здатне до горіння, гниття та витримує багаторазовий вплив пари під тиском 0,2 Мпа. Далі повітря проходить через індивідуальний фільтр, який ще називають фільтром тонкого бактеріального очищення (на схемі не показаний). Він повинен забезпечити очищення повітря від часток діаметром 0,3 мкм на 99,9%. Далі повітря надходить безпосередньо у ферментер.



						Аркуш
						28
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Рис. 2.3. Технологічна схема установки для очищення повітря: 1 – фільтр; 2 – компресор; 3 – теплообмінник; 4 – вологоуловлювач; 5 – ресивер; 6 – теплообмінник; 7 – головний фільтр [21].

2.2.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Мийним та дезінфікуючим засобам потрібно відповідати ряду загальних нормативних вимог. Наприклад, розчинність засобів у воді повинна бути не менше 10% при температурі 50 °С, при розведенні не більше, ніж 1:20, час дії 15-20 хвилин. Мийна здатність засобів повинна оцінюватися мінімум як "добре". У мийно-дезінфікуючих засобах, які містять поверхнево-активні речовини, поверхневий натяг не повинен перевищувати 60 мН/м, крайовий кут змочування не повинен бути більшим за 90°С, піноутворення не повинно перевищувати 50% об'єму розчину, а стійкість піни - не більше 0,3 одиниць. Розчини засобів не повинні призводити до корозії металевих деталей більше, ніж на 2,0 г/м²-рік. Тривалість дії на дійкову гуму після впливу засобів не повинна перевищувати 20 мм за 14-15 днів. Мийно-дезінфікуючі засоби повинні мати бактерицидну дію щодо санітарно-показової мікрофлори при температурі 50 °С та експозиції 1 хв у розведенні не менше, ніж 1:200.

Також, до вимог, які ставляться до мийно-дезінфікуючих засобів, включають:

- Хорошу розчинність у воді;
- Легке і повне змивання під час споліскування;
- Відсутність стійкого запаху і безбарвність;
- Пожежо- та вибухобезпечність;
- Слабка корозійна активність;
- Немає агресивного впливу на матеріали;
- Стійкість під час зберігання;

- Не знижувати ефективності протягом тривалого часу;
- Безпека для довкілля та повна розкладність на нешкідливі речовини;
ДБП.ПЗ.162.04
- Бактерицидна дія щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів;
- Широкий спектр протимікробної активності.

2.2.3.1 Миючі засоби

Миючі засоби або детергенти - це різновид хімічних засобів для очищення різних поверхонь та матеріалів від різних видів забруднень. Вони мають спеціальні властивості, які можуть бути спрямовані на боротьбу з різними видами бруду, а також можуть бути універсальними. Детергенти можуть бути використані вручну або з використанням обладнання в побуті та на підприємствах. Найпоширеніші форми детергентів - мило, пральний порошок та рідкі суспензії. Деякі детергенти ефективно очищують від харчових забруднень, інші - від маслянистих, кіптяви, сажі тощо.

Існують різні типи миючих засобів, які використовуються для різних цілей, таких як очищення різних поверхонь та збереження чистоти в будинку, автомобілі, офісі і т.д. Однак, правильний вибір миючого засобу може бути складним, тому що існують різні класифікації. Основні групи миючих засобів включають тверді, порошкові, пастоподібні та рідкі засоби, які можна використовувати при різних температурах та за різних умов. Також, миючі засоби можуть бути одно- або багатокomпонентними і призначеними для різних цілей, таких як прання текстилю, миття тіла, миття посуду і т.д. Є також різні типи мил, які можуть бути твердими, рідкими або пастоподібними, і які можуть містити різні компоненти для додання естетичного зовнішнього вигляду та запаху [22].

Класифікація мийних засобів:

						Аркуш
						39
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

- За агрегатним станом: порошкові, гранульовані, пастоподібні, рідкі, гелеподібні, тверді;
- За кількістю діючих компонентів: однокмпонентні, багатокмпонентні;
- За видом: лужні, кислотні, синтетичні, дезінфікуючі.

Миючі засоби вибираються відповідно до таких критеріїв: миюча здатність, універсальність та зручність використання, об'єм, ціна, дизайн упакування, обсяг розфасування, екологічні властивості та діапазон температурного використання.

2.2.3.2 Підбір концентрації миючих засобів

Для здійснення санітарної обробки необхідно використовувати засоби, які мають дозвіл уповноважених органів державного нагляду і контролю відповідно до їх компетенції. Концентрації лужних миючих та кислотних миючих засобів залежать від ступеня забруднення оброблюваного об'єкту. Для приготування мийних, мийно-дезінфікуючих і дезінфікуючих розчинів, а також для ополіскування використовують воду з водопроводу, яка відповідає вимогам ДСТУ 7525:2014 «Вода питна».

2.2.3.3 Обґрунтування вибору миючого засобу для обладнання

Для вибору мийного засобу для ферментера та усього виробничого приміщення керувалась такими факторами: ефективність, безпечність як для людини так і для робочих поверхонь, економічність застосування та ціна.

Оскільки, обраний ферментер виготовлений із нержавіючої сталі, то мийний засіб повинен добре очищати сталь та не спричиняти її корозії у подальшій перспективі. Одним із таких засобів є «Лойран - Про Foam

(Про14)» - лужний миючий засіб зі стабілізатором піни для поверхневої мийки устаткування з антибактеріальним впливом. Ефективний для видалення органічних (жир, білок) і неорганічних (солі, молочний камінь) забруднень. Має підвищене піноутворення, що необхідне для зовнішньої мийки технологічного обладнання.

Властивості:

- добре емульгує жири;
- видаляє забруднення органічної (жир, білок) і неорганічної (солі, молочний камінь) природи, що утворюються на внутрішніх поверхнях технологічного обладнання;
- містить біорозчинний ПАР

При використанні обов'язково дотримуватись правил безпеки, оскільки концентрат і робочі розчини - їдкі (4 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007).

При роботі застосовувати:

- засоби захисту очей - герметичні окуляри (ГОСТ 12.4.013-85);
- засоби захисту органів дихання - універсальний респіратор типу РГД (ГОСТ 12.4.004-74) або РУ-60М з патроном марки В (ГОСТ 17269-71);
- засоби захисту шкіри - гумові рукавички.

Цей засіб демонструє ефективність при низьких концентраціях (0,5-2%) у воді будь-якої жорсткості, незалежно від температури води. Він легко змивається з поверхонь і не залишає слідів. Крім того, засіб добре піниться, утворюючи стійку стабільну піну, що дозволяє його використовувати для відмивання вертикальних поверхонь та важкодоступних місць.

Дуже економний у використанні, оскільки це концентрат і його потрібно розводити до 1-2% для машинної мийки, максимум до 2-4% для ручної мийки, тому не зважаючи на ціну 472 гривні, тари на 10 л вистачить на довго.

Призначення засобу: Це лужний мийний засіб з підвищеною піноутворюваністю та антимікробною дією, який призначений для видалення

						Аркуш
						32
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

жирових та білкових забруднень з технологічного обладнання, трубопроводів та ємностей, а також для миття водостійких поверхонь (наприклад, стін, підлог) у виробничих приміщеннях, цехах, а також в харчовій промисловості, громадському харчуванні та в комунальному господарстві.

Використання: концентрат зберігати в оригінальній тарі у сухому приміщенні при температурі від -10°C до 30°C , 12 місяців з дня виготовлення.

Фасування: каністри по 10 л [23].

2.2.3.4 Дезинфікуючі засоби

Дезинфекційні засоби — це хімічні речовини, біологічні агенти та засоби медичного призначення, що застосовуються для проведення заходів по дезінфекції, що включають антисептику.

2.2.3.5 Обґрунтування вибору методу дезінфекції

Виділяють п'ять основних методів дезінфекції: хімічний, фізичний, механічний, біологічний та комбінований. Кожен з цих методів може використовуватись у практиці як окремо, так і в комбінації з іншими.

Основний метод дезінфекції - хімічний, який використовує різні хімічні речовини та сполуки для знищення патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів на поверхнях, всередині об'єктів та предметів навколишнього середовища, а також в повітрі та субстратах.

Фізичний метод дезінфекції здійснюється за допомогою різних фізичних факторів, таких як кип'ятіння, випалювання та ультрафіолетове опромінення. Основою фізичного методу є термообробка, проте більшість патогенних мікроорганізмів можуть витримувати високу температуру, тому вибір конкретного методу залежить від багатьох факторів, таких як мета знезараження, тип оброблюваного об'єкта, вид збудника та умови, в яких здійснюється дезінфекція.

Механічна дезінфекція - це зменшення концентрації мікроорганізмів на об'єктах навколишнього середовища шляхом вологого прибирання, миття

рук, видалення зараженого шару ґрунту, фільтрація води, прибирання приміщень пирососом тощо. Біологічний метод дезінфекції полягає у знищенні збудників інфекційних захворювань мікробами-антагоністами, але цей спосіб не застосовують через його трудомісткість [24].

Серед усіх можливих, хімічний метод дезінфекції є найефективнішим та найменш енергозатратним, тому доцільно використовувати саме його для дезінфекції приміщення.

2.2.3.6 Обґрунтування вибору способу дезінфекції

Варіанти хімічної дезінфекції:

- Занурення – вироби, які потребують обробки занурюють/заливають дезінфікуючим розчином та витримують певний час згідно інструкції. Великі об'єкти за можливості розбираються, канали і порожнини заливають дезінфікуючим розчином.

- Розпилення (зрошування) - використовується для знезараження великих поверхонь. Для розпилення використовують гідропульти або ручні обприскувачі.

- Протирання – використовується для дезінфекції поверхонь виробів.

- Засипання – використовується для знезараження інфікованих біологічних матеріалів.

Найбільш простим та зручним є спосіб протирання, проте на біотехнологічному виробництві доцільним також є використання способу занурення та засипання. Спосіб залежить від об'єкту, який необхідно знезаразити. Тому найкращим варіантом буде знайти засіб, який можна використовувати залежно від потреб очищення виробництва. Ідеальною формою такого засобу є порошок, який потребує розведення – в готовий розчин можна як занурювати, так і протирати ним.

2.2.3.7 Обґрунтування вибору дезінфікуючого засобу для приміщень

						Аркуш
						34
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Для дезінфекції приміщення та обладнання можна використовувати засіб «Дезактін», який випускається у формі порошку та призначений для дезінфекції об'єктів та достерилізаційного очищення виробів медичного призначення.

Даний засіб виявляє антимікробні властивості проти широкого спектру бактерій, вірусів, має фунгіцидні та спороцидні властивості. Засіб «Дезактін» виявляє змочувальні, емульгуючі та мийні властивості. Чудово видаляє механічні, білкові, жирові забруднення, залишки крові, залишки лікарських засобів із зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів та порожнин виробів медичного призначення.

Активно діюча речовина засобу – дихлорантин 21-23 % (містить до 72% активного хлору) у поєднанні з аніонно поверхнево-активними речовинами створює чудовий мийний та дезінфекційний засіб. Він є повністю безпечний за умови дотримання правил безпеки використання даного засобу. У рекомендованих концентраціях не виявляє шкірно-подразнювальних властивостей, не подразнює слизову оболонку очей. Не спричиняє шкірно-резорбтивної та сенсibiliзуючої дії. Не виявляє мутагенних та ембріотоксичних властивостей (за активно діючою речовиною).

Ефективно працює при низьких концентраціях (0,5-2%) у воді будь-якої жорсткості у гарячій та холодній воді. Повністю розчиняється та добре змивається з поверхонь, не залишає слідів. Має легкий запах хлору. Не сумісний з катіонними поверхнево-активними речовинами та спиртами.

Використання: Допускається застосовувати невикористаний протягом 3 діб робочий розчин з метою достерилізаційного очищення виробів протягом 14 днів.

Фасування: саше до 50 г, полімерні банки до 1-2 кг, мішки до 20 кг [25].

						Аркуш
						34
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

2.3 Розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу

2.3.1 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл ми отримуємо $V_{кр/ц} = 28,5$ л культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу необхідна для виробничого біосинтезу (із врахуванням витрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%)) складатиме:

$$V_{роб.1} = V_{кр/ц} / 1 - E_{ф} = 28,5 / 1 - 0,1 = 31,6 \text{ л,}$$

де $E_{ф}$ – витрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.} = 31,6$ л.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап.} = 0,6$ геометричний об'єм ферментера складатиме $V_{ф.1} = 31,6 / 0,6 = 52,6$ л. Прийmemo найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 50$ л та перерахуємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.1} = V_{роб.1} / V_{сф} = 31,6 \text{ л} / 50 \text{ л} = 0,63.$$

Новий коефіцієнт заповнення перебуває у допустимих межах. Кількість посівного матеріалу для внесення у ферментер становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища для внесення у ферментер становитиме:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / 1 + X_{ф} = 31,6 / 1 + 0,1 = 28,7 \text{ л}$$

де $X_{ф}$ – відсоток посівного матеріалу для ферментера.

Об'єм посівного матеріалу для внесення у ферментер становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс} = 31,6 - 28,7 = 2,9 \text{ л}$$

2.3.2 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 5 л

Для отримання 2,9 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу для культивування в інокуляторі (із врахуванням витрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм 1}} / 1 - E_{\text{ін}} = 2,9 / 1 - 0,1 = 3,2 \text{ л}$$

Тоді геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін}} = 3,2 / 0,6 = 5,3$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{с. ін.}} = 5$ л та перерахуємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{с. ін.}} = 3,2 / 5 = 0,64.$$

Новий коефіцієнт заповнення перебуває у допустимих межах. Тоді кількість поживного середовища для внесення в інокулятор складатиме:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / 1 + X_{\text{ін}} = 3,2 / 1 + 0,1 = 2,9 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм 2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 3,2 - 2,9 = 0,3 \text{ л} = 300 \text{ мл}$$

2.3.3 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

Для одержання 300 мл посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 500 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зап. колб}} = 0,2$. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм 2}} / V_{\text{колб}} \times K_{\text{зап. колб}} = 300 \text{ мл} / (500 \text{ мл} \times 0,2) = 3 \text{ шт.}$$

Проведемо аналогічні розрахунки кількості робочого об'єму (поживне середовище + посівний матеріал)

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм 2}} / 1 - E_{\text{колб}} = 300 \text{ мл} / 1 - 0,1 = 333,3 \text{ мл}$$

Сумарний об'єм поживного середовища для внесення у колби складатиме:

$$V_{\text{пс } 3} = V_{\text{роб. } 3} / 1 + X_{\text{колб}} = 333,3 / 1 + 0,1 = 303 \text{ мл}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для колби становить:

$$V_{\text{пм } 3} = V_{\text{роб. } 3} - V_{\text{пс } 3} = 333,3 - 303 = 30,3 \text{ мл}$$

Отже, для одержання посівного матеріалу необхідна 3 качалочні колби та 3 пробірки. Таким чином, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу біомаси кишкової палички у ферментері об'ємом 50 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у два етапи.

2.4 Обґрунтування способу приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу

2.4.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Вирощування посівного матеріалу EsNL4 відбувається в середовищі LB такого складу (г/л):

Триптон – 10;

Дріжджовий екстракт – 5;

NaCl – 0,5

Na₂HPO₄ – 6;

KH₂PO₄ – 3;

NH₄Cl – 1;

1M MgSO₄ – 2 мл;

CaCl₂ – 0,1 г;

Глюкоза – 10 г.

Розрахунок компонентів складу поживного середовища на підготовку посівного матеріалу і проведення основного біосинтезу наведено у табл. 2.2.

ДБП.ПЗ.162.04

Таблиця 2.2.

Розрахунок компонентів складу поживного середовища на підготовку посівного матеріалу і проведення основного біосинтезу

Компоненти ПС	Композиція	г/л	Параметри стерилізації
Глюкоза	1	10	121°C, 0,05 МПа протягом 30 хв
Триптон		10	
Дріжджовий екстракт		5	
NaCl	2	0,5	131°C, 0,15 Мпа протягом 40 хв
NH ₄ Cl		1	
1М MgSO ₄ , мл		2	
CaCl ₂ ,		0,1	
Na ₂ HPO ₄	3	6	131°C, 0,15 Мпа протягом 40 хв.
KH ₂ PO ₄		3	

Глюкозу можна стерилізувати разом із триптоном та дріжджовим екстрактом.

Фосфорні солі Na₂HPO₄, KH₂PO₄ потрібно стерилізувати окремо від інших солей, задля уникнення утворення осаду та взаємодії з ними.

Солі NaCl, NH₄Cl є добре розчинні та їх іони у водному розчині не утворюють між собою нерозчинних солей, тому їх можна стерилізувати разом. Разом з ними можна стерилізувати солі MgSO₄, CaCl₂ – тому що вони у малій концентрації, тому не зможуть утворити осад при взаємодії.

Після стерилізації усі розчини зливаються в реактор, де буферна суміш доводиться стерильною водою, перемішується та нагрівається до необхідної температури. Для корекції показника рН готують 40% розчин лугу: 400г NaOH + 600г деіонізованої води.

Умови приготування та стерилізації середовища ніяк не відрізняється від необхідного об'єму поживного середовища, змінюється лише об'єм збірника (колб).

2.4.1.1 Вирощування інокуляту в колбах

Склад поживного середовища LB (модифіковане) для вирощування *Escherichia coli* Nissle 1917 L4 містить термолабільні компоненти та солі, які при взаємодії можуть давати осад, тому умовно ділимо складові середовища на такі композиції, які відрізняються режимом стерилізації:

Композиція 1: глюкоза, триптон, дріжджовий екстракт. Режим стерилізації – 121°C, 0,05 МПа протягом 30 хв.

Композиція 2: NaCl, CaCl₂, MgSO₄, NH₄Cl. Режим стерилізації – 131°C, 0,15 МПа протягом 40 хв.

Композиція 3: Na₂HPO₄, KH₂PO₄. Режим стерилізації – 131°C, 0,15 МПа протягом 40 хв.

Для стерилізації композицій на цьому етапі нам необхідно 3 колби на 250 мл. Усі композиції стерилізують у автоклаві.

2.4.1.2 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 5 л

Для цієї стадії вирощування біосами 3,2 л композиції поживного середовища не змінюються по складу, збільшується лише об'єм композицій.

Композиція 1: глюкоза, триптон, дріжджовий екстракт. Режим стерилізації – 121°C, 0,05 МПа протягом 30 хв.

Композиція 2: NaCl, CaCl₂, MgSO₄, NH₄Cl. Режим стерилізації – 131°C, 0,15 МПа протягом 40 хв.

Композиція 3: Na₂HPO₄, KH₂PO₄. Режим стерилізації – 131°C, 0,15 МПа протягом 40 хв.

					ДБП.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		39

Процес приготування та стерилізації композиції 1 відбувається у інокуляторі на 5 л, композиції 2 – у збірнику ємністю 3 л. Композицію 3 стерилізують у колбі на 500 мл у автоклаві.

Отже, на цьому етапі встановлюють збірник ємністю 3 л для стерилізації композиції 2.

2.4.1.3 Вирощування інокуляту в ферментері об'ємом 50 л.

Для цієї стадії вирощування біосами 31,6 л композиції поживного середовища не змінюються по складу, збільшується лише об'єм композицій.

Композиція 1: глюкоза, триптон, дріжджовий екстракт. Режим стерилізації – 121°C, 0,05 МПа протягом 30 хв.

Композиція 2: NaCl, CaCl₂, MgSO₄, NH₄Cl. Режим стерилізації – 131°C, 0,15 МПа протягом 40 хв.

Композиція 3: Na₂HPO₄, KH₂PO₄. Режим стерилізації – 131°C, 0,15 МПа протягом 40 хв.

Процес приготування та стерилізації композиції 1 відбувається у ферментері ємністю 50 л. композицію 2 готують та стерилізують у інокуляторі на 5 л. Композицію 3 стерилізують у збірнику на 3 л.

2.4.1.4 Вирощування культури в ферментері об'ємом 50л.

На даному етапі необхідно приготувати 31,6 л поживного середовища, стерилізація компонентів якого описана у розділах 2.4.1. та 2.4.1.3.

					ДБП.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		40

РОЗДІЛ 3 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

3.1 Таксономічний статус

Кишкова паличка це представник умовно-патогенної мікрофлори, яка населяє кишківник людини. При правильному балансі кишкової палички, вона може забезпечити до 50-80% травлення та здійснює захисний вплив на кишечник від дії чужорідних бактерій. Проте існують також патогенні штами, які можуть викликати захворювання ШКТ. Рід *Escherichia* належить до Proteobacteria класу Gamma Proteobacteria, ряду Enterobacteriales, родини Enterobacteriaceae.

Домен: Bacteria

Тип: Proteobacteria

Клас: Gamma Proteobacteria

Ряд: Enterobacteriales

Родина: Enterobacteriaceae

Рід: *Escherichia*

Вид: *Escherichia coli*

Штам: *Escherichia coli* Nissle 1917 L4 [26].

3.2 Морфолого-культуральні властивості

Бактерії виду *Escherichia coli* – грамнегативні бактерії, мають вигляд коротких паличок, із заокругленими кінцями, розмір 1,1–1,5×2,0–6,0 мкм, спор не утворюють. Штам *Escherichia coli* Nissle 1917 L4 має здатність до руху за допомогою джгутиків, які розташовані перетрихіально. Розможується шляхом бінарного ділення.

					ДБП.ПЗ.162.04		
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			
Розробив		Савчук О. М.			РОЗДІЛ 3 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		
Перевірив		Волошина І. М.					
					Д	41	3
Н.Контр.					КНУТД, ББТ-19		
Затвердив							

За типом живлення *Escherichia coli* є хемоорганогетеротрофом: джерело енергії – хімічне, донор електронів – органічна речовина, джерелом вуглецю є органічні сполуки.

Бактерії *Escherichia coli* невибагливі до поживних середовищ. При рості у рідких середовищах спостерігається помутніння середовища та поява осаду. Бактерії утворюють пласкі опуклі S-колонії з рівними або трішки хвилястими краями (3–5 мм у діаметрі) або сухі пласкі R-колонії з нерівними краями при рості на щільних поживних середовищах. Мають здатність розщеплювати лактозу на диференційно-діагностичних середовищах з накопиченням кислоти, тому колонії набувають яскравого кольору: на середовищі Ендо – колонії набувають малинового кольору, можлива наявність металевго блиску; на середовищі ЕМС (Левіна) – колонії темно-фіолетового кольору, можлива наявність металевго блиску; на середовищі Плоскірева – колонії мають червоний колір із жовтим відтінком.

Генетична видозміна м/о

Даний штам створений на основі пробіотичного штаму *E. Coli Nissle 1917* з метою синтезу бактерією (R)- β -гідроксибутирату (ЗНВ) – основного компоненту кетонних тіл, який має терапевтичний ефект, а саме зниження болю та симптомів прояву колітів. Для конструювання плазмиди вчені використали бактерії *Escherichia coli* S17-1, метод Gibson Assembly. Культивування EcN і *E. coli* S17-1 проходило на середовищі LB з додаванням 10 г/л глюкози при 37°C. Задля уникнення горизонтального переносу генів та збереження стабільності плазмиди – весь шлях синтезу ЗНВ вбудовано у бактеріальний геном *E. Coli Nissle 1917* для застосувань *in vivo*, а саме в міжгенну область *malE* і *malK*, враховуючи надійність експресії генів у цьому місці. Для збільшення титру ЗНВ були створені різні штамми для тестування різних промоторів, серед яких штам EcNL4 показав кращу продуктивність в мікроаеробних умовах з результатом від 0,5 г/л ЗНВ [14].

										Аркуш
										42
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата						

ДБП.ПЗ.162.04

3.3 Фізіолого-біохімічні ознаки

Escherichia coli – це факультативні анаероби, можуть рости у присутності кисню, та його відсутності. Чутливі до високої температури та дезінфектантів. Оптимальними умовами для культивування є температура 37°C, значення кислотності рН 7,2–7,8.

Escherichia coli має здатність розщеплювати глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, арабінозу, маніт та інші вуглеводи до кислоти і газу. Здатність розщеплювати білок виражена слабо, відновлюють нітрати до нітритів, утворюють індол, не утворюють сірководень та не розріджують желатин. Бактерії *Escherichia coli* є оксидазо-негативні й каталазо-позитивні. [26].

						Аркуш
						43
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 4

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1 Поетапна блок-схема технології

Технологічна схема отримання біомаси колібактерину наведена на аркуші формату А3 (додається). Вона включає стадії допоміжних робіт, а саме санітарної підготовки виробництва, підготовка стерильного аераційного повітря, приготування та стерилізація поживних середовищ; основного технологічного процесу, який включає підготовку посівного матеріалу, виробничий біосинтез та зберігання культуральної рідини; та знешкодження рідких, твердих та газоподібних відходів.

4.2 Опис технологічної схеми

Для отримання ефективного пробіотика для лікування та профілактики неспецифічного виразкового коліту на основі *E. coli* Nissle 1917 L4 використовується наступна технологічна схема, яка включає в себе допоміжні роботи, технологічний процес, пакування, маркування та відвантаження, а також знешкодження відходів.

ДР.1. Санітарна підготовка виробництва

ДР.1.1. Підготовка персоналу

ДР 1.1.1. Навчання персоналу

Перед початком роботи, персонал інструктують про порядок виконання роботи та правила техніки безпеки, вчать грамотно працювати з обладнанням. Персонал обов'язково проходить щорічні курси підвищення кваліфікації.

ДР 1.1.2. Медичний огляд

~~Перед допуском до роботи, персонал повинен пройти медичний огляд,~~

					ДБП.ПЗ.162.04			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Аркуш	Аркушів
Розробив		Савчук О. М.				Д	44	14
Перевірив		Волошина І. М.						
Н.Контр.								
Затвердив								
						КНУТД, ББТ-19		

результати якого дійсні один рік, задля уникнення негативного впливу виконання роботи на здоров'я людини та навпаки.

ДР 1.1.3. Підготовка одягу

Перед початком робочої зміни, використаний багаторазовий бавовняний робочий одяг перевіряють на цілісність, відібрають та утилізують непридатний для використання одяг, решту загружають у пральні машини та перуть у теплій воді з додаванням прального порошку на температурі 40-50°C при кількості обертів від 400 об/хв протягом 40 хвилин, висувають у сушильній машині при температурі до 80°C протягом однієї години, прасують та відправляють на виробництво.

ДР 1.1.4. Підготовка засобів індивідуального захисту

Перед прибиранням персонал одягає засоби індивідуального захисту, а саме: герметичні окуляри, універсальний респіратор та гумові рукавички. Захисні засоби змінюють при порушенні їх цілісності чи погіршенні захисних властивостей.

ДР.1.2. Підготовка дезінфікуючих та мийних засобів

Перед початком роботи необхідно прибрати саме приміщення та обладнання, тому важливим етапом є підготовка мийних та дезінфікуючих засобів, підбір концентрацій залежно від типу прибирання.

ДР.1.2.1. Підготовка матеріалів для прибирання

Для протирання робочих поверхонь, стін, стелі, дверей та вікон застосовують паралонові губки або серветки із синтетичного матеріалу, які виготовлені із безворсові тканини. Для миття підлоги застосовують світлі ганчірки із цупких тканин. Матеріали й інвентар, які призначені для прибирання виробничих приміщень, маркують та зберігають у спеціальному приміщенні.

ДР.1.2.2. Підготовка мийних засобів («Лойран - Про Фоам (Про14)»)

Перед роботою одягнути засоби індивідуально захисту описані у ДР 1.1.4. Для щоденного прибирання готується концентрація 2% миючого засобу на необхідний об'єм теплої води (на ємність об'ємом 10 л необхідно узяти 9,8 л теплої води (40°C) та 200 мл даного концентрату). Для генерального прибирання готується мийний розчин концентрацією 4% (9,6 л води і 400 мл концентрату відповідно). Час витримки миючого засобу на поверхні устаткування – до 15-20 хв, не допускають висихання розчину на поверхні. Використовують щітку для кращого очищення поверхонь. Миючий розчин змивають чистою теплою водою.

ДР.1.2.3. Підготовка дезінфікуючих засобів для приміщень та поверхонь обладнання

Для дезінфекції приміщень та обладнання використовують порошковий засіб «Дезактін», який добре розчиняється у воді. Для щоденних та генеральних прибирань готують розчини концентрацією 0,5% (5 г на 1 л води (30°C)) та 2% (20 г на 1 л води) відповідно. Після проведення дезінфекції поверхні протирають чистою водою та провітрюють приміщення. Робочі розчини можуть зберігатись протягом 3-х діб після приготування.

ДР.1.2.4. Підготовка миючих засобів для обладнання (каустична сода)

Для очищення ферментера усередині від органічних залишків після процесу біоситезу застосовують 20% розчин каустичної соди (200 г каустичної соди на 1 л чистої води (40°C)) та жорстку щітку, яка використовується лише для ферментера. Об'єм мийного розчину залежить від об'єму ферментера.

ДР.1.2.5. Підготовка дезінфікуючих засобів для персоналу

						Аркуш
						45
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Дезінфекуючих засобів для персоналу (очищення рук) повинно бути як мінімум два, які необхідно змінювати кожні 3 місяці – 70% спирт та Стериліум.

ДР.1.3. Підготовка ферментера ДБП.ПЗ.162.04

ДР.1.3.1. Технічний огляд обладнання

Ферментер візуально перевіряють на цілісність. Підтягують різьбові фланцеві з'єднання на самому обладнанні і на трубопроводах. Калібрують датчики тиску, температури та кислотності [27].

ДР.1.3.2. Миття та ополіскування апарату

Ферментатор ополіскують гарячою питною водою (70°C) протягом 2-3 хв. За допомогою щітки та 20%-го розчину каустичної соди (від ДР 1.2.4) усувають усі видимі забруднення усередині апарату, важливу увагу приділяють місцям, де можуть затримуватись органічні частки. Після очищення апарат ополіскують теплою питною водою (30-35°C) протягом 5-ти хвилин. Ззовні застосовують миючі та дезінфікуючі засоби «**Лойран - Про Foam (Про14)**» та «Дезактін» (від ДР 1.2.2 та ДР 1.2.3) згідно з інструкцією [23,25].

Перед початком роботи ферментер оглядають на наявність поломок, на стан та цілісність дрібних деталей, щільність їх прилягання. Оглядають справність як цілого ферментера так і окремі його деталі, такі як мішалка та барботер. Оцінюють справність барботера та подачі повітря шляхом наповнення ферментера водою до рівня повного занурення барботера та пропусканням повітря протягом кількох хвилин. Оцінюється кількість, розмір та розміщення бульбашок повітря.

ДР.1.3.3. Перевірка на герметичність

Перед стерилізацією ферментер перевіряють на герметичність. Для цього намилюють розчином господарського мила усі зовнішні вузли

						Аркуш
						46
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

ферментера (фланцеві з'єднання) та усі стики (зварні шви) деталей та створюють надлишковий гідравлічний тиск (0,2-0,5 атм), спостерігають за манометром. Якщо тиск на манометрі не змінюється упродовж 2-3 хв, тоді можна переходити до стерилізації апарату. В інакшому випадку будуть утворюватися мильні бульбашки. Це свідчить про нещільність апарату, тому потрібно усунути такий недолік.

Також перевіряють посівну та повітряну лінії. Фіксують наявність мильних бульбашок.

ДР.1.3.4. Стерилізація обладнання та комунікацій

Перед початком стерилізації обладнання промивають гарячою водою 100°C. Ферментер та комунікації (холодильник, комунікації від холодильника до ферментера, лінія транспортування культуральної рідини, фільтри тонкого очищення повітря) стерилізують гострою насиченою паром.

Люк ферментера закривають та подають глуху пару у сорочку (весь метал прогрівається), при відкритті каналу дають гостру пару температурою 110°C у середину ферментера на півтори години при тиску 0,2 Мпа. Протягом наступних 3,5 годин обладнання охолоджується. Індивідуальні фільтри стерилізують при тиску 0,12–0,15 МПа протягом 1 години. За 30 хвилин до кінця стерилізації необхідно пропарити пробовідбірники, штуцер для засіву та зливну лінію від ферментера до трапа протягом 30 хвилин. Після закінчення стерилізації обладнання у ферментер подають стерильне повітря через барботер при надлишковому тиску 0,02—0,03 Мпа.

Далі відводять конденсат. Ферментер охолоджується до температури ферментації + 10-20 градусів (40-50). Вносять компоненти поживного середовища з ДР 3.3. Глуха пара для стерилізації середовища (подається у сорочку) [28].

ДР.1.4. Підготовка приміщень

						Аркуш
						48
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

ДР.1.4.1. Щоденне прибирання

Щоденне прибирання включає у себе вологе прибирання та дезінфекційну обробку (від ДР 1.2.2 та ДР 1.2.3). Вологе прибирання поверхонь виробничих приміщень проводять теплою водопровідною водою ($45\pm 5^{\circ}\text{C}$) з додаванням 2% мийного засобу. Після цього, проводиться обробка дезінфекційним засобом. ДБП.ПЗ.162.04

ДР.1.4.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводять раз у тиждень. Воно включає у себе заходи щоденного прибирання описані у ДР.1.4.1 зі збільшенням концентрації, яка описана у ДР.1.2.1 та ДР.1.2.2. Після закінчення вологого прибирання поверхні приміщення обробляють ультрафіолетовим випромінюванням кварцовою лампою, довжина хвиль якої складає від 100 до 280 нм або бактерицидним опромінювачем, довжина хвиль якого коливається у межах від 200 до 295 нм. Під час опромінювання (1,5-2 години) увесь персонал покидає приміщення. Після завершення ультрафіолетової обробки приміщення провітрюють [28].

ДР 2. Підготовка стерильного аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють через спеціальні шахти, які знаходяться у найменш забрудненій території виробництва, висотою не менше ніж 10 м від даху виробничої будівлі.

ДР 2.2. Очищення повітря від пилу і механічних часток

Внизу шахтової споруди встановлюють фільтри грубої очистки, які очищають повітря від пилу та інших механічних домішок. Ефективність очищення повітря сягає 50-85% за допомогою масляних (фільтр Рекка) або вісцинових фільтрів. $P =$ на початку 65 Па, а в кінці 250 Па.

ДР 2.3. Стиснення повітря

						Аркуш
						49
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Повітря надходить у компресор, де стискається за тиску не менше 0,2МПа (оптимально 0,35-0,4МПа). Під час цього температура повітря підвищується до 140-160°C (220-250°C при більшому тиску). Згладження пульсацій стисненого повітря відбувається у ресивері (повітрязбірнику), який може бути частиною компресора або окремою ємністю [29].
ДБП.ПЗ.162.04

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене нагріте повітря охолоджується у теплообміннику-рекуператору до температури 25-30°C, внаслідок чого утворюються дрібні краплі вологи. Далі охолоджене повітря прямує у вологовідділювач, де збирається волога та виводиться із апарату. Вміст вологи у повітрі зменшується до 60%.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Охолоджене повітря прямує до теплообмінника-нагрівача, де нагрівається до температури ферментації (35-50°C). Відсутні видимі краплі вологи, вміст вологи у повітря знижується до 50%.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Стадія грубої очистки повітря здійснюється на головному фільтрі, який не пропускає часточки діаметром від 1 - 1,5 мкм. Ефективність очищення сягає 98%. Р = на початку 80 Па, а в кінці 450 Па.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальних фільтрах

Кінцева очистка повітря здійснюється на індивідуальних фільтрах, які забезпечують очищення від часток діаметром 0,3 мкм на 99,9%. Р = на початку 140 Па, а в кінці 600 Па [27].

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ.

ДР 3.1. Приготування та стерилізація середовища для вирощування інокуляту в колбах.

						Аркуш
						50
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Для накопичення біомаси на качалочній колбі ємністю 750 мл потрібно приготувати 303 мл (0,303 л) поживного середовища – з урахуванням інокуляту 303 мл – 30 мл = 273 мл. Складові компоненти та їх кількість для приготування середовища наведено в табл. 4.1.

ДБП.ПЗ.162.04 *Таблиця 4.1.*

Компоненти ПС	Ком пози ція	Концентра ція,г/л	Вміст компонента у 0,303 л ПС, г	Об'єм композиції, мл	Об'єм ємкості, мл
Глюкоза	1	10	3,03	91	250
Триптон		10	3,03		
Дріжджовий екстракт		5	1,52		
NaCl	2	0,5	0,15	91	250
NH ₄ Cl		1	0,3		
1М MgSO ₄ , мл		2	0,61 мл		
CaCl ₂ ,		0,1	0,03		
Na ₂ HPO ₄	3	6	1,82	91	250
KH ₂ PO ₄		3	0,91		

За допомогою відкаліброваних ваг зважують 3,03 г триптону, 3,03 глюкози та 1,52 г дріжджового екстракту, наважки вносять у колбу об'ємом 250 мл та додають 91 мл дистильованої води, перемішують скляною паличкою. Колбу закривають чистою ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 121°C протягом 30 хв. Потім передають на стадію ДР 3.2.

За допомогою електронних ваг зважують наступні солі: 0,15 г NaCl, 0,303 г NH₄Cl, 0,03 г солі CaCl₂ та вносять їх у колбу об'ємом 250 мл.

Самплером відібрають 0,61 мл (61 мкл) 1М розчину $MgSO_4$ та вносять у колбу. До суміші додають 91 мл дистильованої води та перемішують. Колбу закривають чистою ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при $131^\circ C$ протягом 40 хв. Потім передають на стадію ДР 3.2.

На вагах зважують 1,82 г, Na_2HPO_4 , 0,909 г KH_2PO_4 та вносять у колбу об'ємом 250 мл. Додають 91 мл дистильованої води та перемішують. Закривають колбу чистою ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при $131^\circ C$ протягом 40 хв. Потім передають на стадію ДР 3.2.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 5 л.

Для вирощування інокуляту наступної стадії ферментації необхідно 3,2 л поживного середовища. Враховують об'єм рідкого посівного матеріалу, який вноситься – 303 мл (приблизно 10% від об'єму середовища), тому змінюється загальна кількість води, яку потрібно внести: $3,2 \text{ л} - 0,3 \text{ л} = 2,9 \text{ л}$. Складові компоненти та їх кількість для приготування середовища наведено в табл 4.2.

Таблиця 4.2.

Компоненти ПС	Ком пози ція	Концентра ція, г/л	Вміст компонента у 3,2 л ПС, г	Об'єм композиції, мл	Об'єм ємкості, л
Глюкоза	1	10	5	1600	5
Триптон		10	32		
Дріжджовий екстракт		5	15,8		
NaCl	2	0,5	1,6	1400	3
NH_4Cl		1	3,2		
1М $MgSO_4$, мл		2	6,4 мл		

Аркуш

51

CaCl ₂ ,		0,1	0,32		
Na ₂ HPO ₄	3	6	19,2	200	0,5
KH ₂ PO ₄		3	9,6		

За допомогою відкаліброваних електронних ваг зважують 5 г глюкози, 32 г триптон^{ДБП.ПЗ.162.04} та 15,8 г дріжджового екстракту, наважки вносять у інокулятор ємністю 5 л та додають 1,6 л питної води, перемішують. Стерилізують в автоклаві при 121°C протягом 30 хв.

За допомогою електронних ваг зважують наступні солі: 1,6 г NaCl, , 3,2 г NH₄Cl, 0,32 г солі CaCl₂ та вносять їх у колбу об'ємом 3 л. Самплером відібрають 6,4 мл 1М розчину MgSO₄ та вносять у колбу. До суміші додають 1,4 л питної води та перемішують. Колбу закривають чистою ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131°C протягом 40 хв.

За допомогою електронних ваг зважують наступні солі: 19,2 г Na₂HPO₄, 9,6 г KH₂PO₄ та вносять їх у колбу 0,5 л та додають 200 мл дистильованої води та перемішують. Закривають колбу чистою ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131°C протягом 40 хв. Композиції 2,3 у стерильних умовах подають до композиції 1 у інокулятор на 5 л, перемішують. Стерильно вносять біомасу, вирощену в ДР 3.1. Після процесу біосинтезу культуральну рідину відправляють у ДР 3.3.

ДР 3.3. Приготування і стерилізація середовища для вирощування біомаси в ферментері об'ємом 50 л.

Для вирощування інокуляту наступної стадії ферментації необхідно 31,6 л поживного середовища. Враховують об'єм рідкого посівного матеріалу, який вноситься – 3,2 л (приблизно 10% від об'єму середовища), тому змінюється загальна кількість води, яку потрібно внести: 31,6 л – 3,2 л = 28,4 л. Складові компоненти та їх кількість для приготування середовища наведено в табл. 4.3.

						Аркуш
						53
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Таблиця 4.3.

Компоненти ПС	Ком пози ція	Концентра ція,г/л	Вміст компонента у 31,6 л ПС, г	Об'єм композиції, мл	Об'єм ємкості, л
Глюкоза	1	10	316	25	50
Триптон		10	316		
Дріжджовий екстракт		5	45,45		
NaCl	2	0,5	15,8	2	5
NH ₄ Cl		1	31,6		
1М MgSO ₄ , мл		2	73,2 мл		
CaCl ₂ ,		0,1	3,16		
Na ₂ HPO ₄	3	6	189,6	1,4	3
KH ₂ PO ₄		3	94,8		

За допомогою відкаліброваних електронних ваг зважують 316 г глюкози, 316 г трипτονу та 45,45 г дріжджового екстракту, наважки вносять у ферментер ємністю 50 л та додають 25 л питної води. Вмикають мішалку для забезпечення перемішування. Стерилізують при 121°C протягом 30 хв.

За допомогою електронних ваг зважують наступні солі: 15,8 г NaCl, 31,6 г NH₄Cl, 3,16 г солі CaCl₂ та вносять у інкулятор ємністю 5 л. Мірним циліндром відмірюють 73,2 мл 1М розчину MgSO₄ та вносять у колбу. До суміші додають 2 л питної води та перемішують. Вмикають режим перемішування до повного розчинення (швидкість перемішування 100-150 об/хв). При потребі розчин можна нагріти до температури 35-40°C шляхом подачі пари у сорочку. Розчин стерилізують при 131°C протягом 40 хв.

					ДБП.ПЗ.162.04	Аркуш
						54
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

За допомогою електронних ваг зважують 189,6 г Na_2HPO_4 , 94,8 г KH_2PO_4 та вносять у колбу об'ємом 3 л. Додають 1,4 л дистильованої води та перемішують. Закривають колбу чистою ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131°C протягом 40 хв. Композиції 2,3 у стерильних умовах подають до композиції 1 у ферментер ємністю 50 л, перемішують. Стерильно вносять культуральну рідину, вирощену в ДР 3.2.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *E.coli* Nissle 1918 L4 зберігають у пробірках на скошеній поверхні агаризованого середовища Лурія-Бертані (LB) при температурі 4°C . Пересів культури здійснюється в умовах стерильності кожні 3-4 місяці.

ТП 4.2 Отримання робочої культури

Музейну культуру, що зберігається в пробірках зі скошеним LB, стерильно пересівають на чашки Петрі із агаризованим середовищем LB за допомогою прожареної мікробіологічної петлі для отримання та ідентифікації окремих колоній культури. Чашки ставлять у термостат на 24 години при температурі 37°C .

Ізольовані колонії в асептичних умовах пересіяти у 3 пробірки на скошену поверхню агару середовища LB за допомогою мікробіологічної петлі. Пробірки ставлять у термостат та інкубують 24 години при температурі 37°C .

ТП 4.3. Вирощування культури в колбах

У попередньо простерилізовану колбу об'ємом 750 мл вносять у стерильних умовах стерильні композиції 1, 2, 3 (від ДР 3.1.). У пробірки з робочою культурою *E.coli* Nissle 1918 L4, вирощеній на LB (від ТП 4.2), вносять по 5 мл стерильного фізіологічного розчину за допомогою смплера,

						Аркуш
						55
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

суспендують клітини та відбирають отриману бактеріальну суспензію з трьох пробірок, переносять у колбу . Колбу закривають стерильною ватно-марлевою пробкою. Усі дії здійснюються в асептичних умовах. Культуру бактерій вирощують у колбі на качалці (37 °С, швидкість перемішування 100 об/хв) протягом 18 годин. Кожні 4 години відбирають пробу культуральної рідини для здійснення мікробіологічного контролю щодо відсутності сторонньої мікробіоти та визначення концентрації біомаси.

ТП 4.4. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 5 л.

У стерильний інокулятор подають стерильні композиції 1, 2, 3 (від ДР 3.2.). За необхідності, рН середовища коректують до значення 7 шляхом додавання титруючих розчинів 6 %-м NaOH або 6 %-м HCl. Посівний матеріал (від ТП 4.3) вносять через засівну колбу, яку в асептичних умовах з'єднують із окремим штуцером.

Температура культивування 37°C, значення кислотності коливається в межах $7 \pm 0,2$, швидкість перемішування 200 об/хв. Процес культивування триває 18 годин. Кожні 4 години відбирають пробу культуральної рідини для здійснення мікробіологічного контролю щодо відсутності сторонньої мікробіоти та визначення концентрації біомаси. Відпрацьоване повітря подають на знешкодження відходів (ЗВ 7.3).

ТП 5. Виробничий біосинтез

ТП 5.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 50 л.

У стерильний ферментер самоплином подають стерильні композиції 1, 2, 3 (від ДР 3.3). За необхідності, рН середовища коректують до значення 7 шляхом додавання титруючих розчинів 6%-м NaOH або 6%-м HCl. Посівний матеріал передають через трубу перетискування з 5-ти літрового ферментера з ТП 4.5.

Температура культивування 37°C, значення кислотності коливається в межах $7 \pm 0,2$, швидкість перемішування 200 об/хв. Процес культивування

						Аркуш
						56
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

триває 48 годин. Кожні 4 години відбирають пробу культуральної рідини для здійснення мікробіологічного контролю щодо відсутності сторонньої мікробіоти та визначення концентрації біомаси. Відпрацьоване повітря подають на знешкодження відходів (ЗВ 7.3.).

ТП 6. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину (від ТП 5.1) подають у стерильний збірник за допомогою насосу. Культуральна рідина зберігається у збірнику до початку стадії очищення біомаси за температури $20^{\circ}\text{C}\pm 1$.

ЗВ 7. Знешкодження відходів

ЗВ 7.1. Знешкодження рідких відходів

Відпрацьовану воду після миття та дезінфекції, промивну воду (від ДР 1.3, ДР 1.4) відправляють на очисні споруди, після яких вода відводиться до каналізації.

ЗВ 7.2. Знешкодження твердих відходів

Залишки біомаси (від ТП 5.1) після фільтрації культуральної рідини відправляють на утилізацію.

ЗВ 7.3. Знешкодження повітряних відходів

Відпрацьоване повітря від ферментерів (від ТП 4, ТП 5) відправляють у системи очистки повітряних відходів та виводяться в атмосферу.

						Аркуш
						57
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 5

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

5.1 Методики контролю на стадії біосинтезу

Цільовим продуктом нашого виробництва є пробіотик – монокомпонентний лікарський препарат для лікування колітів на основі бактерій кишкової палички, тому важливою складовою є мікробіологічний контроль культури, ідентифікація, її кількісний вміст, визначення антагоністичних властивостей, визначення концентрації β – гідроксибутирату, проведення дослідів на мишах. Контроль необхідно проводити на всіх стадіях виробництва, починаючи з перевірки чистоти приміщень, перевірки чистоти, справності та герметичності обладнання, перевірки якості сировини та води, яка використовується для поживного середовища, її мікробіологічний контроль згідно з вимогами специфікації. Необхідно точно дотримуватись вимог щодо стерилізації обладнання та комунікацій, стерилізації аераційного повітря та контроль його мікробіологічної чистоти. Важливим є контроль під час біосинтезу, а саме відбирання проб, ідентифікація культури та підтвердження відсутності контамінації.

Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль під час біосинтезу здійснюють за допомогою відбору проб з пробовідбірника, який є встановленим у ферментер. Отримані проби об'ємом 1 мл аналізують за допомогою методу Коха, який дозволяє визначити загальну кількість бактерій шляхом десятикратних розведень стерильною водою чи фізіологічним розчином.

1. Для отримання розведення 10^{-1} 1 мл культуральної рідини у стерильних умовах наливають у стерильну пробірку, додають 9 мл

	стерильної води	або фізіологічного розчину та ресуспендують сампером. Для	ДБП.ПЗ.162.04				
Зм.	Форми Маніля	Підпис	Дата				
Розробив	Савчук О. М.			РОЗДІЛ 5 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив	Волошина І. М				Д	58	7
					КНУТД, ББТ-19		
Н.Контр.							
Затвердив							

розведення 10^{-2} 1 мл з першої пробірки відбираємо стерильно у другу пробірку та додаємо 9 мл стерильної води або фізіологічного розчину. Повторюємо до отримання розведень 10^{-8} - 10^{-9} .

2. На стерильні чашки Петрі з м'ясо-пептоним агаром здійснюють посів дослідної проби методом виснажуючого штриха у стерильних умовах у трьох повторностях для кожної концентрації.

3. Отримані посіви інкубують у термостаті при температурі 37°C протягом 48 годин.

4. Результати повинні підтверджувати відсутність сторонньої мікрофлори. Морфологічні показники перевіряють за допомогою мікроскопії.

Кількість життєздатної культури визначають за допомогою методу Коха, описаного вище. Єдина відмінність полягає у концентрації солі розчину, який використовується для десятикратних розведень – 0,85% ізотонічний розчин натрію хлориду. Після інкубації при 37°C рахують кількість колоній. Також одним із способів підрахунку клітин є підрахунок у камері Горяєва, проте живі клітини, які можна побачити у мікроскопі не завжди можуть ділитись, тому цей спосіб не є достовірним.

Хіміко-технологічний контроль

Контроль переважно здійснюється за допомогою панелі ферментера, який показує актуальні дані температури, тиску та кислотності середовища, оптичну густина, вміст аераційного повітря. У разі змін кислотності необхідно додати титруючі розчини.

5.2 Методи контролю цільового продукту

Кислотність

Значення рН готового розчину повинна дорівнювати $7\pm 0,2$.

Ідентифікація культури

Фарбування по Граму

ДБП.ПЗ.162.04

1. На знежирене скельце наносимо краплю дистильованої води.
2. Охолодженою прожареною мікрбіологічною петлею беремо зразок культуральної рідини/колонії, вирощеної за методом Коха та розмазуємо тонким шаром по скельці у краплі води.
3. Після того, як вода висохне фіксуємо мазок над полум'ям паяльника протягом кількох секунд.
4. Нанести барвник генціановий фіолетовий на 2-3 хвилини. Змити водою. Залишки вологи видаляють фільтрувальним папером.
5. Нанести розчин Люголя на 1-2 хвилини та змити 96% спиртом до повного знебарвлення. Промити водою та підсушити.
6. Нанести фуксин або сафранін на 2-5 хвилин, змити водою та дати підсохнути.
7. Мікроскопію зразка проводять при збільшені 90x за допомогою імерсії.

Мазки повинні показати короткі палички із заокругленими кінцями, рожево-червоного кольору (грамнегативні).

При культивуванні препарату на м'ясо-пептоному агарі протягом 18-ти годин спостерігається утворення круглих колоній, при культивуванні на середовищі Ендо – колонії малинового кольору з металевим блиском.

Мікробіологічна чистота

У препараті не повинно міститись сторонньої мікрофлори. Для перевірки готуємо 10-% розчин препарату у фізіологічному розчині та робимо посіви на чашки Петрі по 1 мл у трьох повторностях:

						Аркуш
						59
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

- на м'ясо-пептоному агарі для визначення загальної кількості бактерій;

- на середовищі Сабуро для визначення загальної кількості грибів та дріжджів.

Посіви на МПА інкубують при температурі 37°C, посіви на середовищі Сабуро – при 20-25°C протягом 5-ти діб. ДБП.ПЗ.162.04

У препараті не повинні міститись будь-які інші мікроорганізми, окрім кишкової палички. У випадку виявлення сторонньої мікрофлори дослід повторюють у подвоєній кількості посівів. У разі відсутності росту інших мікроорганізмів при повторному посіві досліджуваній препарат вважають відповідним до вимог. У разі повторного росту сторонньої мікрофлори серію препарату бракують.

Визначення кількості живих бактерій

Визначення загальної кількості життєздатних бактерій кишкової палички проводять методом Коха шляхом десятикратних розведень та підрахунку колоній, описаного у пункті 5.1 (*Мікробіологічний контроль*).

Також кількість життєздатних бактерій можна визначити за допомогою спеціальних датчиків, які можуть бути вміщені у ферментер [30].

Визначення антагоністичних властивостей

Визначення антагоністичної активності базуються на методах змішаного культивування, які виявляють зони пригнічення росту чутливих бактерій на щільних середовищах, або на виявленні співвідношення кількості колоній досліджуваного антагоніста та індикаторних бактерій на рідких середовищах.

Escherichia coli Nissle 1917 L4 повинна володіти високими антагоністичними властивостями проти *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis* та інвазивної *E. coli* [14].

						Аркуш
						60
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Визначення антагоністичних властивостей можна проводили *in vitro* в лабораторії двома дифузійними методами: відтермінованого антагонізму та перпендикулярних штрихів.

Метод перпендикулярних штрихів ДБП.ПЗ.162.04

1. На чашки Петрі (у трьох повторностях) наносять краплю культуральної рідини *Escherichia coli* Nissle 1917 L4 за допомогою мікробіологічної петлі.

2. Починаючи з країв чашки з макроколонією дослідного штаму *E.coli* Nissle 1917 L4, у напрямку до центру штрихом висівали відповідні добові тестові культури за допомогою мікробіологічної петлі, дотримуючись відстані між ними.

3. Чашки інкубують у термостаті при температурі 37 ± 1 °C протягом 24 год. Результати оцінюють візуально за довжиною штриха від краю чашки у напрямку до центру, фіксується наявність зон, які вільні від росту тестових культур мікроорганізмів на цьому відрізьку площини.

Метод відтермінованого антагонізму

1. Добові культури мікроорганізмів, які чутливі до досліджуваного штаму, сіють на м'ясопептонний бульйон (МПБ) та культивують протягом 6 годин у термостаті при 37 ± 1 °C. Додатково можна перевірити антагоністичну дію пробіотики на *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 6538.

2. На 2,0 %й м'ясо-пептонний агар на чашках Петрі вносять 1 мл суспензії культуральної рідини *Escherichia coli* Nissle 1917 L4, яка містить 10^2 (КУО)/см³ та інкубують при 37°C протягом 24 годин. Далі у чашку Петрі вносять 2-3 мл хлороформу, щоб повністю покрити усю поверхню чашки, та витримують протягом 5 хвилин, далі хлороформ зливають та підсушують поверхню МПА з макроколоніями у стерильних умовах протягом 30 хвилин

						Аркуш
						61
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

3. Отриманні тестові культури із пункту 1. у кількості 100 мкл вносять у пробірки з 5 мл 7%-го напіврідкого поживного агару, температурою 45°C. Швидко перемішують та розливають на підсушені чашки Петрі із пункту 2. Після застигання верхнього шару агаризованого середовища із тестовою культурою, чашки ставлять у термостат на 24 години при 37°C.

Досліди проводять у трьох повторностях. ДБП.ПЗ.162.04

Для аналізу результатів визначають діаметр зон інгібування росту тестових бактерій або їх відсутність навколо макроколоній досліджуваних бактерій пробіотика: діаметр затримки росту 7-14 мм – умовно низька антагоністична активність; 14-26 мм – середня; 27-36 мм – висока; більше 36 мм – дуже висока [31].

Визначення адгезивних властивостей

Адгезивні властивості мікроорганізмів визначають методом Бриліса на формалізованих еритроцитах людини першої групи крові (O (1) Rh+) шляхом імерсійної мікроскопії, на попередньо пофарбованих мазках фарбою Романовського – Гімзи протягом 40 хвилин (фарба змивається водою). Оцінка адгезивних властивостей базується на підрахунку кількості мікробних клітин, які прикріпились до одного еритроциту (для розрахунку беруть не менше 50-ти еритроцитів) – індекс адгезивності мікроорганізмів (ІАМ). Адгезивність вважається нульовою при ІАМ нижче 1,75, низькою – при ІАЕ від 1,76 до 2,5, середньою – від 2,51 до 4,0, високою – вище 4,0 [32].

Адгезивність *Escherichia coli* Nissle 1917 L4 повинна бути середньою.

Визначення β-гідроксибутирату

Визначити вміст β-гідроксибутирату у рідині можна за допомогою експрес тестів. Одну краплю досліджуваної рідини поміщають на спеціальну смужку, потім її аналізують у спеціальному ручному вимірювальному

						Аркуш
						63
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

приладі для визначення концентрації бета-гідроксибутирату. Їх ефективність при лабораторних дослідженнях становить 95% [33].

У культуральній рідині вміст β -гідроксибутирату має становити не більше 0,5 г/л [14].

Досліди на мишах

ДБП.ПЗ.162.04

Для проведення досліду на мишах необхідно окреме приміщення та навчений персонал. Місце проживання та харчування тварин повинне забезпечувати усі їхні потреби. Перед проведенням дослідження тварин утримують на карантині протягом 10 діб на збалансованому харчуванні. Для експерименту беруть 5 білих мишей масою 19-21 г та заражають індукованим декстрансульфатом натрію (DSS) колітом. Важлива наявність контрольної групи для спостереження за перебігом хвороби без лікування пробіотиком, також спостереження за здоровими особинами.

Досліджуваній групі щодня вводять одну дозу препарату (1 мл) перорально через шприц. Термін спостереження – не менше 5-ти діб. Усі особини досліджуваної групи повинні бути живі та без втрат у масі. У протилежному випадку, експеримент необхідно повторити з подвоєною кількістю тварин. Якщо у повторному досліді усі тварини залишились живі та не мають втрат у масі, то препарат можна використовувати. У протилежному випадку – партію утилізують. Дане дослідження необхідно проводити згідно з етичними принципами «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 18 березня 1986 р.) [32, 34].

									Аркуш
									64
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата					

ВИСНОВКИ

Переважна більшість населення України страждає дисбактеріозом, унаслідок неправильного харчування та способу життя. Зміна нормального балансу мікрофлори кишечника людини проявляється у різних хворобливих станах, серед яких діарея, загальна втома, нудота, відсутність апетиту. Терапія пробіотиками у таких випадках не раз показувала свою ефективність, адже пробіотики здатні відновити правильний баланс мікроорганізмів та зменшити кількість патогенів завдяки своїм антагоністичним властивостям.

Одним із таких пробіотиків є препарати на основі пробіотичних штамів *Escherichia coli*, які лікують кишкові інфекції, спричинені патогеною *E. coli*, та кількісну зміну кишкової палички у кишківнику. Також дані пробіотики використовують для профілактики хронічної хвороби – неспецифічного виразкового коліту.

Ми розглянула різні препарати-пробіотики, виготовлені на основі *Escherichia coli*, та штами, які найчастіше застосовуються – оцінила їх переваги та недоліки, провела аналіз наукової літератури щодо удосконалення даних штамів. Ми обрала найбільш ефективний штам у лікуванні колітів, який немає негативного впливу на кишечник живих організмів – штам *Escherichia coli* Nissle 1917 L4, отриманий із першого пробіотичного штаму кишкової палички - *Escherichia coli* Nissle 1917, шляхом інтегрування плазмиди у хромосому бактерії, яка здатна продукувати (R)- β -гідроксибутират – речовину, яка зменшує симптоми колітів, підтримує та покращує баланс здорової мікрофлори кишківника.

Для забезпечення населення України даним пробіотиком я розрахувала потужності виробництва при заповненні ринку на 50%. Для виготовлення річної потужності виробництва мені необхідний ферментер на 5 л Sartorius

					ДБП.ПЗ.162.04		
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			
Розробив		Савчук О. М.			Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Волошина І. М.			Д	65	2
					КНУТД, ББТ-19		
Н.Контр.					ВИСНОВКИ		
Затвердив							

Biostat Cplus(Фінляндія), ферментер Techfors на 50 л (Швейцарія) та чверть року (квартал) роботи. Для росту на накопичення біомаси я обрала середовище LB, тому що воно є найбільш економічно вигідне. Для накопичення необхідної біомаси для ферментера 5 л мені попередньо потрібен такий посуд для ферментації: збірник на 3 л, одна колба ємністю 0,5л та три колби на 250 мл. Крім того, мені необхідна система стерилізації повітря.

						Аркуш
						66
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Колібактерін-Біофарма інструкція по застосуванню: веб-сайт. URL: <https://medpravda.ua/ua/preparat/kolibakterin-biofarma> (дата звернення: 24.10.2022).
2. В ООН порахували, скільки українців виїхали за кордон: рекордна кількість: веб-сайт. URL: <https://www.unn.com.ua/uk/news/1991409-v-oon-porakhuvai-skilki-ukrayintsiv-viyikhali-za-kordon-rekordna-kilkist> (дата звернення: 24.10.2022).
3. Запальні захворювання кишечника: веб-сайт. URL: <http://amnu.gov.ua/zapalni-zahvoryuvannya-kyshechnyku/> (дата звернення: 25.10.2022).
4. Виразковий коліт і діти – складні питання діагностики та лікування: веб-сайт. URL: <https://health-ua.com/article/46569-virazkovij-kolt-dti--skladn-pitannya-dagnostiki-talkuvannya> (дата звернення: 25.10.2022).
5. Що таке пробіотики та як вони допомагають нашому кишечнику: веб-сайт. URL: <https://liki24.com/uk/articles/chto-takoe-probiotiki-i-kak-oni-pomogayut-nashemu-kishechniku/> (дата звернення: 25.10.2022).
6. Мутафлор капсули гастрорезист. тв. №20 (10x2): веб-сайт. URL: <https://tabletki.ua/uk/%D0%9C%D1%83%D1%82%D0%B0%D1%84%D0%B%D0%BE%D1%80/8767/> (дата звернення: 25.10.2022).
7. Guarner F., Ellen Sanders M., Eliakim R., Fedorak R., Gangl A., Garisch J., Kaufmann P., Karakan T., Khan G., Kim N., Andrés De Paula J., Ramakrishna V., Shanahan F., Szajewska H., Thomson A., Le Mair A. Пробиотики і пребіотики. Рекомендації Всесвітньої Гастроентерологічної Організації. Серпень 2021. URL: https://diagen.com.ua/wp-content/uploads/2022/04/probiotiki_compressed.pdf (дата звернення: 29.10.2022).

					ДБП.ПЗ.162.04			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив		Савчук О. М.			СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Волошина І. М.				Д	67	5
Н.Контр.					КНУТД, ББТ-19			
Затвердив								

8. Behrouzi A., Mazaheri H., Sarvenaz Falsafi, [Zahra Hoseini Tavassol](#), [Arfa Moshiri](#), [Seyed Davar Siadat](#). Intestinal effect of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 and its OMV. [J Diabetes Metab Disord](#). 2020 Jun; 19(1): 597–604.
9. [Patricia J. Hare](#), [Hanna E. Englander](#), [Wendy W. K. Mok](#). Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits bacterial persisters that survive fluoroquinolone treatment. *J*
10. [Xiaoli Yu](#), [Changsen Lin](#), [Jing Yu](#), [Qingsheng Qi](#), [Qian Wang](#). Bioengineered *Escherichia coli* Nissle 1917 for tumour-targeting therapy. [Microb Biotechnol](#). 2020 May; 13(3): 629–636.
11. [Scaldaferri F.](#), [Gerardi V.](#), [Mangiola F.](#), [Riccardo Lopetuso L.](#), [Pizzoferrato M.](#), [Petito V.](#), [Papa A.](#), [Stojanovic J.](#), [Poscia A.](#), [Cammarota G.](#), Gasbarrini A.. Role and mechanisms of action of *Escherichia coli* Nissle 1917 in the maintenance of remission in ulcerative colitis patients: An update. [World J Gastroenterol](#). 2016 Jun 28; 22(24): 5505–5511.
12. Симбіфлор 2: веб-сайт. URL: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=3181> (дата звернення: 10.11.2022).
13. Enck P., Zimmermann K., Menke G., Klosterhalfen S. Randomized controlled treatment trial of irritable bowel syndrome with a probiotic *E.coli* preparation (DSM17252) compared to placebo. *Z Gastroenterol*. 2009 Feb;47(2):209-14.
14. [Xu Yan](#), [Xin-Yi Liu](#), [Dian Zhang](#), [Yu-Dian Zhang](#), [Zi-Hua Li](#), [Xu Liu](#), [Fuqing Wu](#), [Guo-Qiang Chen](#). Construction of a sustainable 3-hydroxybutyrate-producing probiotic *Escherichia coli* for treatment of colitis. [Cell Mol Immunol](#). 2021 Oct; 18(10): 2344–2357.
15. Rieger P., Chesnokova V. L., Sokurenko E. V. Regulation of type 1 pili expression as exemplified by *Escherichia coli* strain m17. *Bull Exp Biol Med*. 2001 Oct;132(4):977-80.
16. Данилов І. П., Самойленко С. І.. Апарати мікробіологічної промисловості: навч. посіб. Харків, 2008. 272 с.

17. Біостат Cplus. Ферментатор з нержавіючої сталі | Біореактор для вашої лабораторії: веб-сайт. URL: <https://www.sartorius.com/en/products/fermentation-bioreactors/stainless-steel-bioreactors/biostat-cplus> (дата звернення: 23.11.2022).
18. Biostat Cplus The Stainless Steel Fermenter | Bioreactor for Your Laboratory: веб-сайт. URL: <https://www.sartorius.com/download/9612/broch-biostat-cplus-sbi1505-e-data.pdf> (дата звернення: 23.11.2022).
19. Ферментери (біореактор) Techfors, Infors: веб-сайт. URL: <https://unilab.kiev.ua/catalog/fermentery-i-bioreaktory/FermenteryTechforsInfors/> (дата звернення: 25.11.2022).
20. Пілотний біореактор для складних біопроектів: веб-сайт. URL: <https://www.infors-ht.com/en/bioreactors/pilot-bioreactors/techfors/> (дата звернення: 25.11.2022).
21. Стерилізація аераційного повітря: веб-сайт. URL: <https://bioengineering.kpi.ua/attachments/article/277/%D0%93%D0%BB%D0%B0%D0%B2%D0%B0%206.%D0%A7%D0%B0%D1%81%D1%82%D1%8C2.pdf> (дата звернення: 28.11.2022).
22. Компоненти для виробництва миючих засобів: веб-сайт. URL: <https://www.systopt.com.ua/article-komponenty-dlya-proyzzvodstva-moyushhyh-sredstv> (дата звернення: 30.11.2022).
23. Лойран про foam (ПРО14) - миючий засіб для поверхневої мийки устаткування з антибактеріальною дією: веб-сайт. URL: <https://novahim.com.ua/mijuch-zasobi-dlja-pdprimstv-molochno-promislovost/mijuch-zasobi-dlja-ruchnogo-ochischennja-stolv-stn-pdlogi-obladnannja-tari/lojran-pro-foam-pro14-mijuchij-zasb-dlja-poverxnevo-mijki-ustatkuvannja-s-antibakteralnoju-dju> (дата звернення: 05.12.2022).
24. Методи дезінфекції: веб-сайт. URL: <https://interdez.com.ua/press/metody-dezinfektsii.html> (дата звернення: 07.12.2022).

						ДБП.ПЗ.162.04	Аркуш
							69
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			

25. Дезактін. Методичні вказівки (інструкція по застосуванню): веб-сайт.
URL: <https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/dezaktin-metodicheskie-rekomendatsii-instruksiya-po-primeneniyu/> (дата звернення: 07.12.2022).
26. Мінухін В.В., Коваленко Н.І., Замазій Т.М.. Модуль 3. Частина 2. Родина кишкових бактерій : метод. вказ. з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія та імунологія з мікробіологічною діагностикою" до практичних занять для студентів-бакалаврів III–IV курсу за спеціальністю "Лабораторна діагностика". Харків: ХНМУ, 2014. – 44 с.
27. Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості: навч. посіб. Львів, 2008.- 736с.
28. Методичні рекомендації щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів: веб-сайт. URL: <https://ips.ligazakon.net/document/MOZ1571> (дата звернення: 07.05.2023).
29. Нагрівання газів при стисненні їх у компресорах: веб-сайт. URL: http://univer.nuczu.edu.ua/e-books/book_10/1516.html (дата звернення: 07.05.2023).
30. Бондар І.В., Гуляєв В.М. Промислова мікробіологія. Харчова і агробіотехнологія: навч. посіб. Дніпродзержинськ, 2004. – 280 с.
31. Чечет О. М., Коваленко В. Л., Горбатюк О. І., Гайдей О. С., Кравцова О. Л., Андріяшук В. О., Мусієць І. В., Ординська Д. О.. Вивчення *in vitro* антагоністичної активності ізолятів *Bacillus* та відбір перспективних пробіотичних штамів. Науково-технічний вісник Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів і кормових добавок та інституту біології тварин. 2022; 23(1):219-227.
32. Мачуський О. В. Вивчення пробіотичної активності та нешкідливості лактобактерій, виділених у птахогосподарствах України. Науково-технічний вісник Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів і кормових добавок та інституту

						ДБП.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			69

біології тварин. 2021. №2. URL: <https://scivp-journal.com.ua/index.php/journal/article/view/204> (дата звернення: 11.05.2023).

33. Моніторинг і попередження субклінічного кетозу: веб-сайт. URL: <http://milkua.info/uk/post/monitoring-i-poperedzenna-subkliniknogo-ketozu> (дата звернення: 12.05.2023).

34. Вальчук О.А., Мазур В.М., Ковпак В.В., Деркач С.С., Жук Ю.В. Методика дослідницької справи у ветеринарній медицині: навч. посіб. Київ. 2020 – 148 с.

						Аркуш
						70
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

ДОДАТКИ

Додаток А



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Державний біотехнологічний університет
Рейн-Ваальський університет прикладних наук, Німеччина
Університет аграрних наук, м. Уппсала, Швеція
Природничий дослідницький центр, м. Вільнюс, Литва
Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна
Національний аерокосмічний університет ім. М.Є. Жуковського
«Харківський авіаційний інститут»
Львівський національний університет ветеринарної
медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького
КЗ «Харківський зоологічний парк»

АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ, ЕКОЛОГІЇ ТА ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ

МАТЕРІАЛИ МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ

27-28 квітня 2023 р.

Харків
ДБТУ
2023

БІОГЕННИЙ СИНТЕЗ НАНОСРІБЛА МОЛОЧНОКИСЛИМИ БАКТЕРІЯМИ

О.М. Савчук, І.М. Волошина

Київський національний університет технологій та дизайну
oleksandra.ssv2002@gmail.com

Наночастинки срібла широко застосовують у багатьох галузях, однак, важливе значення мають при отриманні лікарських та косметичних засобів, побутової хімії, тощо. Наночастки срібла мають розмір менше 100 нм та відомі своєю антисептичною дією на патогенні мікроорганізми, що обумовлює високий попит на дослідження дії наночастинок срібла у середині людського організму та використання їх як доставки ліків. Актуальність дослідження наночастинок срібла підтверджується тим фактом, щоб патогенні мікроорганізми можуть набувати резистентність до антибіотикотерапії, тому застосування наносрібла як ліків проти грампозитивних і грамнегативних збудників має велику перспективу. Проте не можна стверджувати, що використання наносрібла є панацеєю для лікування певних хвороб та знищення патогенної мікрофлори, адже воно може глибоко впливати на живий організм повністю. Тому актуально досліджувати цитотоксичність наносрібла на цілий організм [1].

Спершу для синтезу наночастинок срібла використовували хімічні та фізичні методи, але використання у них токсичних речовин та розчинників потребує змін на більш екологічні методи синтезу. Серед них, розділ зеленої хімії, який базується на синтезі наночастинок срібла за допомогою рослин та мікроорганізмів. Для цього використовують живі, або зруйновані клітини, або їх метаболіти, не використовуючи при цьому ніяких токсичних речовин [2]. Біогенний синтез має ряд переваг, окрім його екологічності це також економічна ефективність та біосумісність синтезованих наночастинок [3].

Для отримання наночастинок срібла використовують сіль срібла, найчастіше це AgNO_3 , відновник, який окислює аргентум (I) до вільного срібла, стабілізатор чи блокуючий агент, який дозволить контролювати ріст наночастинок і не дає їм з'єднуватись між собою. У разі біогенного синтезу відновником і блокуючим агентом (білок) стають молекули, які виділяють мікроорганізми. Також срібло здатне відновлюватись не лише у клітині мікроорганізму та на її поверхні, а й у надосадовій рідині, у цьому випадку відновником є ферменти виділені клітинами [2].

Молочнокислі бактерії є досить перспективними та ефективними для виробництва наночастинок срібла. В літературі описано синтез наносрібла у надосадовій рідині культури *L. lactis* LCLB56. Для відновлення срібла використовували сіль AgNO_3 , а супернатант доводили до концентрації 1 мМ AgNO_3 , який потім відправляли на 7 днів у темряву на шейкер при 26°C [4]. Було доведено, що LAB-срібло проявляє антимікробні властивості проти грампозитивних (*S. epidermidis* ATCC49461, *S. aureus* ATCC6338) та грамнегативних (*P. aeruginosa* ATCC10145, *P. mirabilis* ATCC25933) патогенів [4]. Здатність до синтезу наночастинок срібла за допомогою молочнокислих бактерій була продемонстрована за допомогою *L. bulgaricus* на середовищі MPC. Отримані наночастки срібла також показали антибактеріальну дію проти *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* та *Salmonella typhi* [5].

Також вивчали бактерицидний вплив наночастинок срібла на самі молочнокислі бактерії, а саме *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* і *L. casei*. Було досліджено, що наночастинки срібла розчиняються у кислому середовищі молочнокислих бактерій, що призводить до збільшення гідроксильних іонів у середовищі, що призводить до загибелі клітини, негативно впливаючи на ДНК. Це дослідження показало, який має вплив кислотність середовища на наявні у ньому наночастинки срібла [6]. Також здатність до синтезу наночастинок срібла виявлено у *Lactobacillus* spp., *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecium* і *Lactococcus garvieae* [7]. Дослідження залежності кислотності середовища на швидкість відновлення срібла, розглянуто на середовищах з *L. fermentum* LMG 8900 з pH 2, 4, 6, 7, 8, 9 та 11,5. Чим

вищою була кислотність – тим вищі показники відновлення срібла та швидкість процесу, окрім кислотності, що відповідає рН 6-8. Серед видів, які здатні відновлювати срібло при високо лужному середовищі є *Lactobacillus* spp., *P. pentosaceus*, *E. faecium*, *L. garvieae* [7].

Варто зазначити, що залежно від виду та штаму мікроорганізму, середовища, умов культивування та внесеної солі і її концентрації залежить розмір та форма отриманих наночастинок. Крім того, наночастинок срібла різних розмірів та форм мають різну антибактеріальну дію на різні види патогенів, тому цей процес потрібно досліджувати далі та опиратись на вже готові дослідження по цій темі [1, 2].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Siddiqi K.S., Husen A., Rao R.A.K. // *J Nanobiotechnology*. 2018. 16; 16(1):14. doi: 10.1186/s12951-018-0334-5.
2. Sintubin L., Verstraete W., Boon N. // *Biotechnol Bioeng*. 2012. 109(10):2422-2436. doi: 10.1002/bit.24570.
3. Gahlawat G., Choudhury A.R. // *RSC Adv*. 2019. 26; 9(23):12944-12967. doi: 10.1039/c8ra10483b.
4. Viorica R.P., Pawel P., Kinga M., Michal Z., Katarzyna R., Boguslaw B. // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017. 101(19):7141-7153. doi: 10.1007/s00253-017-8443-x.
5. Naseer Q.A., Xue X., Wang X., Dang S., Din S.U., Kalsoom, J.J. // *Braz J Biol*. 2021. 5; 82:e232434. doi: 10.1590/1519-6984.232434.
6. Tian X., Jiang X., Welch C., Croley T.R., Wong T.Y., Chen C., Fan S., Chong Y., Li R., Ge C., Chen C., Yin J.J. // *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018. 14; 10(10):8443-8450. doi: 10.1021/acsami.7b17274.
7. Sintubin L., De Windt W., Dick J., Mast J., van der Ha D., Verstraete W., Boon N. // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009. 84(4):741-9. doi: 10.1007/s00253-009-2032-6.

КУЛЬТУРА «БОРОДАТИХ» КОРЕНІВ РОСЛИН ПОЛІНУ ЯК ЕКОЛОГІЧНИЙ ТА ПРОДУКТИВНИЙ СПОСІБ ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК

Т.А. Богданович, В.П. Дуплій, А.М. Шаховський, Я.І. Рагушняк, Н.А. Матвеева

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
bogdanovych_tais@ukr.net

Генетична інженерія нині є широко відомим методом зміни геному рослин. Започаткований у 70-х роках 20 століття, цей метод застосовується для отримання трансгенних рослин різних видів, у тому числі лікарських. Крім того, використання для трансформації бактерій *Agrobacterium rhizogenes* дозволяє отримати культури «бородатих» коренів. Останні характеризуються швидким гормононезалежним ростом, є невибагливими до складу живильного середовища, що робить такі корені перспективним джерелом біологічно активних сполук як альтернативу рослинам, зібраним у їх природних місцях росту. Оскільки «бородаті» корені можна вирощувати цілорічно в умовах *in vitro* на стандартизованому живильному середовищі, а *priori* не забрудненому токсичними сполуками, їх використання як біофабрик цінних сполук є екологічно доцільним та дозволяє зберігати природні популяції лікарських рослин.

Рід *Artemisia* включає багато видів рослин, які ростуть на території України у природних умовах. Наприклад, розповсюдженими є такі рослини як *A. vulgaris* L., *A. absinthium* L. та *A. annua* L., використовувани у народній медицині. Рослини *A. dracunculoides* L. спеціально вирощуються та використовуються у кулінарії. Ще один вид, *A. tilesii* Ledeb., не зустрічається на території України та має дуже обмежений ареал, зокрема, росте на Алясці



II Міжнародна науково-практична
інтернет-конференція

ПРОБЛЕМИ ТА ДОСЯГНЕННЯ СУЧАСНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

20 травня 2022 р.
м. Харків, Україна

токсичність, може виступити інгібітором холінестераз, що руйнують новокаїн в тканинах та сироватці крові людини.

Кінетичні дослідження інгібування проводили спектрофотометрично на УФ-спектрофотометрі SPECORD 200 (Analytic Jena, Німеччина).

Встановлено, що константа швидкості першого порядку гідролізу новокаїну в системі з сироваткою крові людини при додаванні 100 мкМ силібініну достовірно зменшується від $1,26 \pm 0,07 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ до $0,76 \pm 0,07 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ ($p \leq 0,05$), що підтверджує інгібуючі властивості силібініну. При концентраціях силібініну в системі 25, 50 мкМ константа швидкості достовірно зменшується в 1,2 і 1,4 рази відповідно ($K_{i25} = 1,050 \pm 0,001 \times 10^{-3}$, $K_{i50} = 0,880 \pm 0,006 \times 10^{-3}$) ($p \leq 0,05$).

Висновок: вперше достовірно встановлено кінетичні параметри інгібування силібініном процесу деструкції новокаїну ферментами сироватки крові людини. Комбінація новокаїну і силібініну в одній лікарській формі може бути потенційно застосована для фармацевтичної розробки нового лікарського засобу пролонгованої дії.

Вплив наночастинок срібла на організм людини

Савчук О.М., Лупан К.О., Волошина І.М.

Кафедра біотехнології, шкіри та хутра Київського національного університету
технологій та дизайну, Київ, Україна
i_woloschina@yahoo.com

Наночастинки металів набули широкого застосування у різних сферах, від електроніки до медицини. Наночастинки срібла відомі своєю токсичною дією проти мікроорганізмів та пухлин, а їхні розміри дозволяють проникати та вносити з собою різні речовини в складнодоступні місця організму, тому їх часто застосовують у виробництві ліків. Крім того, наночастинки срібла знайшли своє застосування при виготовленні продуктів харчування та їх пакування завдяки своїм антибактеріальним властивостям. Проте, стає питання, як саме будуть діяти ці наночастинки всередині людського організму. Були

проведені дослідження на щурах і виявлено, що регулярне пероральне вживання наночастинок срібла зменшило популяцію лактобактерій та біфідобактерій та збільшило кількість патогених грамнегативних бактерій. Крім того, наночастинок срібла можуть поглинатися імунними клітинами, які знаходяться в епітелії кишечника та здатні викликати запалення, тоді імунна система організму починає секретувати запальні цитокіни. Інше дослідження було основане на прийомі різних концентрацій наночастинок і в результаті здоровий баланс мікробіоти змістився в бік патогеної мікрофлори у кожній групі, а величина зміщення залежала від дози. А при подальшому вживанні наночастинок срібла викликали запалення кишечника. Є припущення, що наночастинок срібла при регулярному потраплянні в організм зв'язуються саме з грампозитивними бактеріями та знищують їх, що дозволяє розвиватись грамнегативним бактеріям. Також, на модифікації наночастинок срібла впливає їжа, яка надходить в організм, та розмір самої наночастинок. В простих системах наночастинок срібла розчиняються, але в справжньому організмі цей процес залежить від багатьох факторів, тому ці процеси потрібно ще ретельно вивчати.

**Деякі аспекти властивостей наночастинок срібла,
отриманих зеленим синтезом**

Савчук О.М., Малиношевська М.О., Шидловська О.А.

Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, Україна
oleksandra.sav2002@gmail.com

Наночастки металів широко застосовуються у різних галузях науки і техніки, в тому числі в біомедичній, харчовій та косметичній. Використання токсичних для навколишнього середовища відновників та стабілізаторів в хімічних та фізичних методах синтезу обмежують спектр використання наночастинок срібла та інших металів (A. Goug & N. K. Jain, 2019). Зелений синтез із використанням бактерій, рослин і рослинних екстрактів, дріжджів тощо можуть стати джерелом біологічно-активних, безпечних, нетоксичних та

економічно вигідних у виробництві наночастинок срібла (Т. М. Abdelghany et al., 2018). Тому, метою даного дослідження є аналіз відомих даних стосовно властивостей «зелених» наночастинок срібла.

Синтезовані зеленим синтезом наночастки срібла з використанням екстракту *Haliclona exigua* мають антибактеріальну активність проти плівкоутворюючих бактерій, що населяють ротову порожнину людини. Інші наночастки срібла, отримані з використанням екстракту *Mentha pulegium* мають антибактеріальну активність проти *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* та *Candida albicans*. Цікаво, що наночастки срібла, синтезовані за допомогою екстракту з *Syzygium cumini* проявляють антибактеріальну дію проти патогенів із множинною лікарською стійкістю, таких як *Salmonella enterica* та *Staphylococcus aureus* (К. С. Hembram et al., 2018).

В якості відновника для зеленого синтезу наночастинок срібла часто використовують саме рослинні екстракти. Так, висушене листя *Datura stramonium*, зібране в період цвітіння рослин з максимальною кількістю фітохімічних речовин, використали для зеленого синтезу наночастинок срібла. Отримані таким способом наночастки срібла володіють високою антиоксидантною активністю та здатністю інгібувати утворення вільних радикалів. Більше того, вони мають ефективну бактеріостатичну дію проти штамів бактерій *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli* — мінімальні бактерицидна концентрація дорівнює 1,28 мкг/мл та 2,56 мкг/мл відповідно (М. Mousavi-Khattat et al., 2018).

Наночастки срібла також можна синтезувати і за допомогою бактерій. Проте, для цього використовують стійкі до впливу срібла штами. Так, показаний зелений синтез на штаммах *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus licheniformis*, *Proteus mirabilis*, а також з використанням супернатантів *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* та різних бактерій родини *Enterobacteriaceae*. Проте, основним недоліком використання бактеріальних моделей для синтезу наночастинок срібла є обмежена кількість розмірів та форм в порівнянні з

використанням рослинних та грибних екстрактів, та слабо-виражена антибактеріальна дія (M. Rafique et al., 2017).

Механізм антибактеріальної дії «зелених» наночастинок срібла пов'язаний з їх антиоксидантною активністю, що проявляється у нейтралізації утворених вільних радикалів шляхом окиснення самих наночастинок (M. Mousavi-Khattat et al., 2018; A. S. Jain et al., 2021). До речі, можливим механізмом утворення наночастинок срібла з використанням рослинних екстрактів є відновлення іонів срібла за допомогою поліфенолів та інших видів флаваноїдів (M. Nasrollahzadeh et al., 2019).

Отже, зелений синтез із використанням рослинних екстрактів має свої переваги перед синтезом наночастинок бактеріями. В результаті синтезу наночастинок рослинами чи їх екстрактами отримується чистий продукт, який не потребує складної очистки, біологічно безпечний. Також, можна досягти вищої стабільності та ефективності наночастинок шляхом регулювання форми та розміру. Більше того, даний метод синтезу легко-доступний, економічний та екологічний. Синтезовані наночастинки із використанням рослинних екстрактів володіють антибактеріальною дією проти широкого спектру патогенних бактерій, що дозволяє розглядати їх як перспективні агенти антибактеріальної терапії.

Екстракційне вилучення антоціанів з рослинної сировини і дослідження їх кінетичної стабільності в спиртових екстрактах

Солдаткіна Л.М., Літвінова В.Е.

Кафедра фізичної та колоїдної хімії, факультет хімії та фармації
Одеського національного університету імені І.І.Мечникова, м. Одеса, Україна
soldatkina@onu.edu.ua

Антоціани належать до сильних антиоксидантів і мають антиканцерогенні, вазопротекторні, протизапальні, протипухлинні, фунгіцидні, антимікробні властивості, проявляють захисну дію щодо зорового апарату людини. У зв'язку з цим, актуальними є дослідження щодо пошуку

ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка персоналу

ДР 1.1.1 Навчання персоналу
Раз у рік

ДР 1.1.2 Медичний огляд
Раз у рік

ДР 1.1.3 Підготовка одягу
t = 60-80°C; τ = 30 хв
до ЗВ 7.1

ДР 1.1.4 Підготовка засобів індивідуального захисту
Перевірка на цілісність

ДР 1.2 Підготовка дезінфікуючих та мийних засобів

ДР 1.2.1 Підготовка матеріалів для прибирання
до ДР 1.4.1
до ДР 1.4.2

ДР 1.2.2 Підготовка мийних засобів («Лойран - Про Фоат (Про14)») (Про14)»
C₁ = 2%, C₂ = 4%, t = 40 °C
до ДР 1.4.1
до ДР 1.4.2

ДР 1.2.3 Підготовка дезінфікуючих засобів для приміщень та поверхонь обладнання
C₁ = 0,5%, C₂ = 2%, t = 30°C
до ДР 1.4.1
до ДР 1.4.2

ДР 1.2.4 Підготовка мийних засобів для обладнання (каустична сода)
C = 20%, t = 40 °C
до ДР 1.3.2

ДР 1.2.5 Підготовка дезінфікуючих засобів для персоналу
C = 70%
на виробництво

ДР 1.3 Підготовка ферментера

ДР 1.3.1 Технічний огляд обладнання
Візуальна перевірка

ДР 1.3.2 Миття та ополіскування апарату
t₁ = 70 °C, t₂ = 35 °C
до ЗВ 7.1

ДР 1.3.3 Перевірка на герметичність
P = 0,05 МПа, τ = 3 хв
до ЗВ 7.1
конденсат

ДР 1.3.4 Стерилізація обладнання та комунікацій
t = 110°C, P = 0,02 МПа, τ = 1,5 год, КУО < 1
до ЗВ 7.1
конденсат

ДР 1.4 Підготовка приміщень

ДР 1.4.1 Щоденне прибирання
t = 45°C, C = 2%
до ЗВ 7.1

ДР 1.4.2 Генеральне прибирання
t = 45°C, C = 4%
до ЗВ 7.1

ДР 2 Підготовка стерильного аераційного повітря

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря
h ≥ 10 м
до ЗВ 7.2

ДР 2.2 Очищення повітря від пилу і механічних часток
P₁ = 0,065 МПа, P₂ = 0,025 МПа, E = 80%
до ЗВ 7.2

ДР 2.3 Стиснення повітря
P = 0,4 МПа, t = 220°C

ДР 2.4 Охолодження повітря та видалення вологи
t = 30°C, W = 60%
конденсат

ДР 2.5 Нагрівання повітря
t = 50°C, W = 50%

ДР 2.6 Очищення повітря в головному фільтрі
P₁ = 0,08 МПа, P₂ = 0,045 МПа, d = 1,5 мкм, E = 98%

ДР 2.7 Очищення повітря в індивідуальних фільтрах
P₁ = 0,014 МПа, P₂ = 0,6 МПа, d = 0,3 мкм, E = 99,9%
до ТП 5.1

ДР 3 Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1 Приготування та стерилізація середовища для вирощування інокуляту в колбах
t₁ = 121°C, τ₁ = 30 хв
t_{2,3} = 131°C, τ_{2,3} = 40 хв, КУО < 1
до ДР 3.2
конденсат

ДР 3.2 Приготування і стерилізація середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 5 л
t₁ = 121°C, τ₁ = 30 хв
t_{2,3} = 131°C, τ_{2,3} = 40 хв, КУО < 1
до ДР 3.3
конденсат

ДР 3.3 Приготування і стерилізація середовища для вирощування біомаси в ферментері об'ємом 50 л
t₁ = 121°C, τ₁ = 30 хв
t_{2,3} = 131°C, τ_{2,3} = 40 хв, КУО < 1
до ТП 5.1
конденсат

ТП 4 Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1 Підтримання колекційної культури
t = 4°C, τ = 3-4 місяці
до ТП 4.2

ТП 4.2 Отримання робочої культури
t = 37°C, τ = 24 год, КУО > 10⁸
до ТП 4.3

ТП 4.3 Вирощування культури в колбах
t = 37°C, n = 100 об/хв, τ = 18 год, КУО > 10⁸
до ТП 4.4

ТП 4.4 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 5 л
t = 37°C, n = 200 об/хв, τ = 18 год, pH = 7, КУО > 10⁸
до ТП 5.1

ТП 5 Виробничий біосинтез

ТП 5.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 50 л
t = 37°C, n = 200 об/хв, τ = 48 год, pH = 7, КУО > 10⁸
до ЗВ 7.3
до ТП 6
конденсат

ТП 6 Зберігання культуральної рідини
t = 20°C ± 1
до ЗВ 7

ЗВ 7 Знешкодження відходів

ЗВ 7.1 Знешкодження рідких відходів
від ДР 1.3
від ДР 1.4
від ТП 6

ЗВ 7.2 Знешкодження твердих відходів
від ТП 6

ЗВ 7.3 Знешкодження повітряних відходів
від ТП 4, 5

				ДБП.ГЧ.162.04			
Зм.	Арх.	№ документа	Підпис	Дата	Літ.	Маса	Масштаб
Розробив	Савчук О.М.				Д		1:1
Перевірив	Волошина І.М.				Аркус 1	Аркус 1	
Н.Контр.					Блок-схема		
Затвердив					КНУТД, ББТ 1-19		