

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**Факультет фармацевтичних технологій та менеджменту**  
**Кафедра біотехнології**

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

**на тему: «ОРГАНІЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА РЕКОМБІНАНТНОГО  
ПРОБІОТИКА»**

**Виконав :** здобувачка вищої освіти групи 162БТ620(3,10з)-01а  
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія  
освітньої програми Біотехнологія

**Катерина ТОРКАЄНКО**

**Керівник:** Завідувачка кафедри біотехнології, д.фарм.н,  
професор Наталя ХОХЛЕНКОВА

**Рецензент:** Начальник відділу фармацевтичної розробки ТОВ  
“БІОЛІК ФАРМА”, к.фарм.н., с.н.с.

**Олена НАЗАРОВА**

Харків – 2025 рік

## АНОТАЦІЯ

Робота присвячена питанням організації виробництва рекомбінантного пробіотика. Розглянуто наукові основи створення рекомбінантних пробіотичних штамів, їх біологічні властивості та перспективи використання у фармацевтичній промисловості. У роботі проведено аналіз технологічного процесу виробництва пробіотичного препарату, що включає культивування, ферментацію, очистку, сублімаційну сушку та фасування. Особлива увага приділена вибору обладнання, розрахунку матеріального балансу, визначенню оптимальних параметрів сублімаційної сушки, а також забезпеченню якості кінцевого продукту. Розглянуто екологічні аспекти виробництва та оцінка безпечності рекомбінантного пробіотика, зокрема можливих ризиків горизонтального перенесення генів та впливу на мікрофлору людини.

*Ключові слова:* рекомбінантний пробіотик, ферментація, сублімаційна сушка, генетично модифіковані мікроорганізми (ГМО).

## ANNOTATION

The work is devoted to the issues of organizing the production of recombinant probiotics. The scientific foundations of the creation of recombinant probiotic strains, their biological properties and prospects for use in the pharmaceutical industry are considered. The work analyzes the technological process of producing a probiotic preparation, which includes cultivation, fermentation, purification, freeze-drying and packaging. Particular attention is paid to the choice of equipment, calculation of the material balance, determination of optimal freeze-drying parameters, as well as ensuring the quality of the final product. The environmental aspects of production and assessment of the safety of recombinant probiotics are considered, in particular, possible risks of horizontal gene transfer and impact on human microflora.

*Keywords:* recombinant probiotic, fermentation, freeze-drying, genetically modified microorganisms (GMOs).

## ЗМІСТ

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| Вступ.....                                                                    | 3  |
| 1 Аналітичний огляд.....                                                      | 6  |
| 2 Характеристика готового продукту, сировини, матеріалів, напівпродуктів..... | 14 |
| 2.1 Характеристика готового продукту.....                                     | 14 |
| 2.2 Характеристика сировини.....                                              | 15 |
| 2.3 Характеристика біологічних об'єктів.....                                  | 20 |
| 2.4 Біосинтез цільового продукту.....                                         | 27 |
| 3 Технологічна частина.....                                                   | 30 |
| 3.1 Розрахунок матеріального балансу.....                                     | 30 |
| 3.2 Розрахунок і вибір обладнання .....                                       | 37 |
| 3.3 Опис технологічного процесу.....                                          | 44 |
| 3.4 Схеми виробництва.....                                                    | 48 |
| 3.5 Контроль виробництва.....                                                 | 52 |
| 3.6 Екологічні аспекти виробництва.....                                       | 54 |
| Висновок.....                                                                 | 57 |
| Список використаної літератури.....                                           | 59 |
| Додатки.....                                                                  | 64 |

|           |                 |          |        |      |                                                                               |                               |      |         |
|-----------|-----------------|----------|--------|------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|------|---------|
|           |                 |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ                                                           |                               |      |         |
| Змн..     | Арк.            | № докум. | Підпис | Дата |                                                                               |                               |      |         |
| Розробив  | Торкаєнко       |          |        |      | Організація виробництва<br>рекомбінантного пробіотика<br>Пояснювальна записка | Літ.                          | Арк. | Аркушів |
| Перевірив | Хохленкова      |          |        |      |                                                                               |                               | 2    | 59      |
| .         |                 |          |        |      |                                                                               | НФаУ<br>Кафедра біотехнології |      |         |
| Н. контр. |                 |          |        |      |                                                                               |                               |      |         |
| Затвердив | Хохленкова Н.В. |          |        |      |                                                                               |                               |      |         |

## ВСТУП

*Актуальність теми.* Сучасний розвиток біотехнологій відкриває нові можливості у створенні ефективних лікарських засобів, зокрема пробіотиків, що мають рекомбінантну природу. Пробіотичні мікроорганізми відіграють важливу роль у підтримці здоров'я людини, нормалізації мікрофлори кишечника, а також у зміцненні імунної системи. Проте традиційні пробіотики мають обмежену ефективність, що обумовлено їхньою нестійкістю в агресивних умовах шлунково-кишкового тракту та низькою адгезивною здатністю [4].

Рекомбінантні пробіотики є перспективним напрямом у розробці біопрепаратів, оскільки вони мають можливість не лише зберігати корисні властивості природних штамів, а й продукувати біологічно активні речовини, зокрема імуномодуючі білки, антимікробні пептиди тощо. Вони можуть бути використані у терапії різних захворювань, включаючи аутоімунні патології, хронічні запальні процеси та дисбіози [5].

Актуальність організації виробництва рекомбінантного пробіотика обумовлена глобальною тенденцією до розширення використання пробіотичних засобів у медицині та харчовій промисловості. Згідно зі світовими прогнозами, ринок пробіотиків зростає на 14,1% щороку, що підтверджує важливість досліджень у цій сфері. В Україні також спостерігається підвищений інтерес до створення та впровадження нових пробіотичних препаратів, зокрема з використанням генно-інженерних технологій [5, 15].

Впровадження у виробництво рекомбінантних пробіотиків потребує детального вивчення всіх аспектів їх розробки, зокрема вибору штаму-продуцента, технологічних етапів отримання, екологічних та безпекових аспектів. Таким чином, дана робота є актуальною та спрямована на вирішення

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 3    |

важливих завдань у галузі біотехнологічного виробництва пробіотичних лікарських засобів.

**Мета роботи.** Метою даної роботи є розробка концепції організації виробництва рекомбінантного пробіотика, що включає вибір оптимального мікроорганізму-продуцента, технологічних умов культивування та сублімаційної сушки, а також оцінку екологічних аспектів виробництва.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні завдання:

1. Провести аналітичний огляд сучасного стану виробництва пробіотиків, зокрема рекомбінантних форм.
2. Дослідити основні технологічні стадії отримання пробіотика, включаючи культивування, ферментацію, очищення та ліофілізацію.
3. Розрахувати матеріальний баланс виробництва.
4. Обґрунтувати вибір обладнання для отримання та сублімаційної сушки рекомбінантного пробіотика.
5. Оформити схеми виробництва згідно із запропонованим описом виробництва.
6. Проаналізувати екологічні аспекти та розробити заходи для мінімізації впливу виробництва на навколишнє середовище.

**Об'єктом роботи** є рекомбінантний штам *Bifidobacterium bifidum* BGN4 [pBESIL10], його властивості та методи отримання стабільної біомаси у вигляді ліофілізованого препарату.

**Предметом роботи** є процес організації виробництва рекомбінантного пробіотика, зокрема технологічні аспекти отримання біомаси мікроорганізму, її зберігання та стабілізації..

**Методи.** Для вирішення поставлених завдань використовувалися аналітичні та розрахункові методи.

**Практичне значення отриманих результатів.** Результати даної роботи можуть бути використані фармацевтичними підприємствами та

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 4    |

біотехнологічними компаніями при розробці та впровадженні у виробництво пробіотичних препаратів нового покоління. Отримані дані сприятимуть оптимізації технологічного процесу, зниженню собівартості виробництва та покращенню якості кінцевого продукту. Дослідження також має значення для подальшого розвитку біотехнологічної промисловості України, підвищення її конкурентоспроможності на світовому ринку пробіотичних препаратів.

Окремі результати роботи представлені на XI Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології» та опубліковані в збірці тез (додаток).

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 5    |

# 1 АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

## 1.1 Сучасні підходи до застосування пробіотиків

Термін «пробіотик» вперше був уведений Ліллі (Lilly) та Стіллвеллом (Stillwell) у 1965 р. як секретовані мікроорганізмами продукти, що посилюють ріст своїх сусідів, хоча ще у 1908 р. Ілля Мечникова представив пробіотики як корисні мікроорганізми для сприятливого покращення мікробіоти кишечника людини, замінюючи шкідливі мікроби, тим самим зміцнюючи здоров'я людини. За ці роки дослідження, спрямовані на вивчення пробіотиків, механізмів їхньої дії та терапевтичних ефектів посилили інтерес до них як до лікарських засобів або дієтичних добавок та функціональних продуктів, що є ефективними для профілактики та лікування багатьох захворювань та станів [15].

Наразі світовий ринок пробіотиків експоненційно зростає, за оцінками багатьох міжнародних організацій він досягає десятків мільярдів доларів. Так, згідно зі звітом Grand View Research у 2023 р. він оцінювався у досягне 87,7 млрд. доларів США, а до 2030 р. очікується приріст на 14,1 % (рис. 1.1).

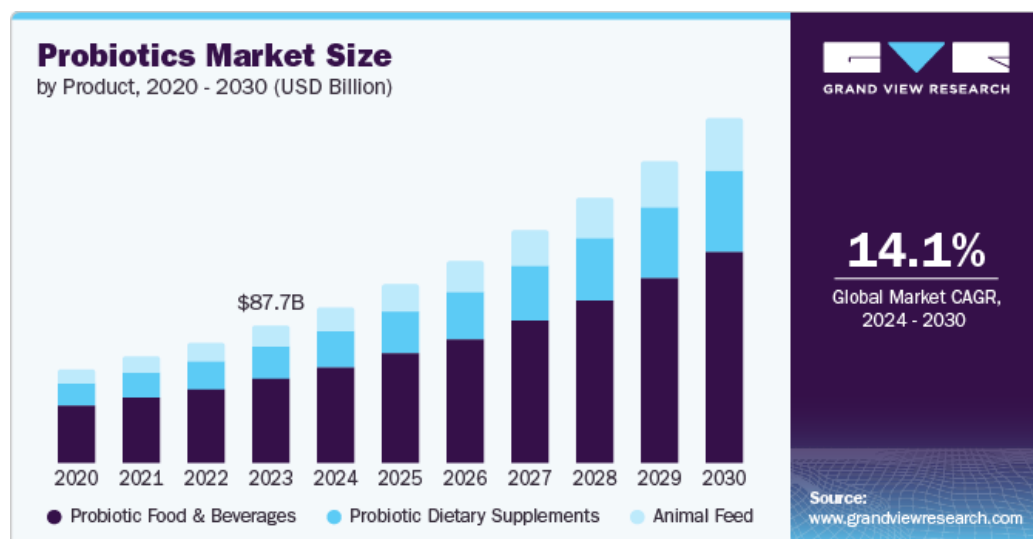


Рис. 1.1 – Динаміка росту ринку пробіотиків

(згідно з <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/probiotics-market>)

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
|      |      |          |        |      |                     | 6    |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     |      |

Зв'язок між мікробіомом кишечника та здоров'ям людини стає все більш очевидним і добре описаним. Тим не менш, на мікробіом постійно впливає низка факторів, таких як спосіб харчування та життя та споживання антибіотиків [15]. Здоровий мікробіом можна зберегти та підтримувати за допомогою різних пробіотиків. Крім того, пробіотичні мікроорганізми більше не обмежуються декількома традиційно використовуваними бактеріями і на сьогодні представлені більш філогенетично різноманітними мікроорганізмами, ніж вважалося раніше [5]. Ці пробіотичні мікроорганізми включають як традиційно використовувані молочнокислі бактерії *Lactobacillus* та біфідобактерії *Bifidobacterium*, так і відносно нещодавно ідентифіковані, зокрема *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium butyricum*, *Streptococcus thermophiles* тощо [10, 33]. Багато з цих пробіотичних штамів мають спільний механізм дії, але також були задокументовані пробіотичні ефекти, специфічні для штаму, виду або роду. Характеристика механізму дії пробіотичних штамів представлено на рис. 1.2 та охарактеризовано під рис. Отже, пробіотичні бактерії та їх активні метаболіти надають певні корисні ефекти шляхом: зміцнення епітеліального бар'єру (1), вироблення антимікробних засобів (2), посилення білка адгезії до слизової оболонки (3), інгібування прикріплення патогенів (4), активації дендритних клітин (5) і конкурентне виключення патогенів (6) (див. рис. 1.2).

Пробіотики вводяться у вигляді живих культур або спор, безпосередньо у вигляді твердих (ліофілізати у формі порошків, таблеток, капсул, супозиторій) або рідких лікарських форм та дієтичних добавок або через ферментовані молочні продукти, їжу та напої. Також існує концепція так званих «метабіотиків», тобто застосування метаболітів пробіотичних штамів. Слід відмітити перспективність застосування трансплантації фекальної мікробіоти, яка успішно використовується для лікування захворювань, таких як діарея, запор, вагініт, некротичний ентероколіт, запальне захворювання кишечника, інфекції *Clostridium difficile* тощо. У останніх дослідженнях

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 7    |

з'являються повідомлення про роль пробіотиків в імуномодуляції, профілактиці серцево-судинних захворювань і навіть раку.

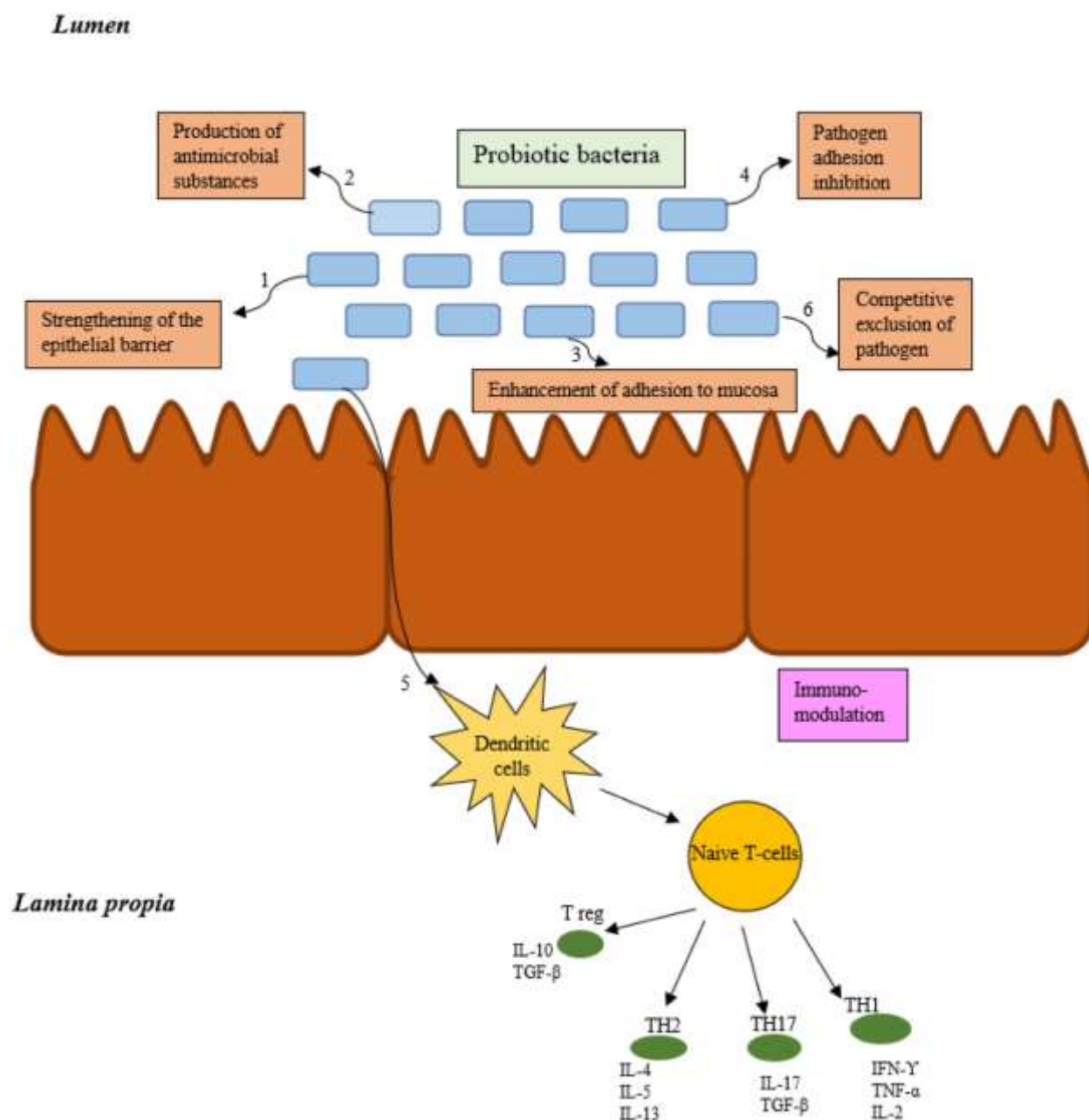


Рис. 1.2 – Механізми дії пробіотичних штамів та транспортування в організмі:

а. Механізм дії пробіотичних бактерій:

1. пробіотичні бактерії можна використовувати для лікування депресії шляхом збільшення популяції корисних бактерій, які ще більше покращують настрої через вісь кишечник-мозок;
2. SCFAs (Short-chain fatty acid, коротколанцюгові жирні кислоти), що виробляються пробіотиками (ацетат, бутират, пропіонат), сприятливо

впливають на кишечник, мозок, а також посилюють вивільнення інтерлейкіна IL-10 і цитокінів;

3. пробіотичні бактерії також змінюють білок щільного з'єднання (tight junction protein), який утворює ущільнення між сусідніми епітеліальними клітинами біля апікальних поверхонь;

4. пробіотичні бактерії взаємодіють з епітеліальними клітинами через тол-подібні рецептори TLR1/TLR2 і індукують посилення передачі сигналів, які беруть участь в імунній відповіді та інших процесах, таких як проліферація клітин, продукція прозапальних цитокінів і диференціювання.

б. Транспортування пробіотиків та їх активних метаболітів/факторів з просвіту кишечника (на рис. Lumen) до слизової (на рис. Lamina propria - шар м'якої тканини, що знаходиться під поверхнею певних ділянок тіла, зокрема слизова оболонка).

(Джерело: Biotechnological Applications of Probiotics: A Multifarious Weapon to Disease and Metabolic Abnormality, Rajnish Prakash Singh, Afreen Shadan, Ying Ma, 2022)

Але незважаючи на розширення кількості видів пробіотичних мікроорганізмів та механізмів їхньої дії, ряд мікроорганізмів у залишаються некультивованими, і багато мікроорганізмів-кандидатів на пробіотики залишаються погано ідентифікованими, що вимагає правильної ідентифікації та ретельної оцінки як пробіотиків. Пробіотикам може бути століття, але вони вимагають нової уваги, зважаючи на останні досягнення, досягнуті в розумінні мікробіому кишечника та ролі цих мікроорганізмів у здоров'ї людини.

Також слід відмітити, що розвиток технологій секвенування генома, а також удосконалення інструментів для редагування та модифікації мікробного геному сприяли вдосконаленню пробіотичних препаратів, зокрема створенню нової генерації – рекомбінантних або генно-модифікованих пробіотиків.

Завдяки посиленому інтересу до пробіотикотерапії та пробіотиків регуляторні органи та організації різних країн у сфері застосування лікарських засобів та продуктів харчування розробили характеристика та вимоги щодо їхнього застосування та виробництва. Так у 2010 р. Продовольчою і сільськогосподарською організацією Об'єднаних Націй (FAO) та Всесвітньою організацією охорони здоров'я (WHO) пробіотики було визначено як «живі мікроорганізми, які надають сприятливий вплив на здоров'я господаря при

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 9    |

введенні в адекватних кількостях». У багатьох фармакопеях світу наявні монографії стосовно цієї групи препаратів, зокрема у Державній фармакопеї України (ДФУ) – ДФУ 2.5, яка гармонізована із Європейською фармакопеєю (EPH) є загальна монографія, в якій пробіотики визначені як живі біотерапевтичні лікарські засоби (ЖБЛЗ). Згідно з цією монографією «живі біотерапевтичні лікарські засоби – це призначені для застосування людиною лікарські засоби, що містять живі мікроорганізми (бактерії або дріжджі)». Однією із вимог до пробіотичних штамів є наявність статусу загально безпечних (GRAS) для США та статусу безпечності, наданого Європейським органом з безпеки харчових продуктів (EFSA) для країн ЄС. Виробництво та застосування нових пробіотиків регулюються Управлінням з продовольства і медикаментів США (FDA) та Європейською медичною агенцією (EMA).

Звісно, в галузі використання рекомбінантних штамів є свої нормативні документи, якими повинні користуватись розробники та виробники рекомбінантних пробіотиків. Зокрема, в Україні для виробництва цієї групи препаратів діють вимоги загальної монографії ДФУ 2.6 «Лікарські засоби, одержувані за допомогою технології рекомбінантної ДНК», згідно з якою пропонується наступне визначення «Лікарські засоби, одержувані за технологією рДНК, виробляють, використовуючи генетичні модифікації, за яких ДНК, що кодує цільовий лікарський засіб, зазвичай вводять за допомогою плазмід або вірусного вектора в придатні мікроорганізми, такі як бактерії та дріжджі, або придатну культуру клітин ссавців (включно з людиною), комах або рослин. Надалі введена ДНК експресується як білок. Далі цільовий лікарський засіб екстрагують й очищають».

У виробництві рекомбінантних організмів, у тому числі і пробіотичних, використовуються різні методи генної інженерії – від системи гомологічної рекомбінації до найефективнішої на сьогодні останнього покоління CRISPR-Cas (рис. 1.3).

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 10   |

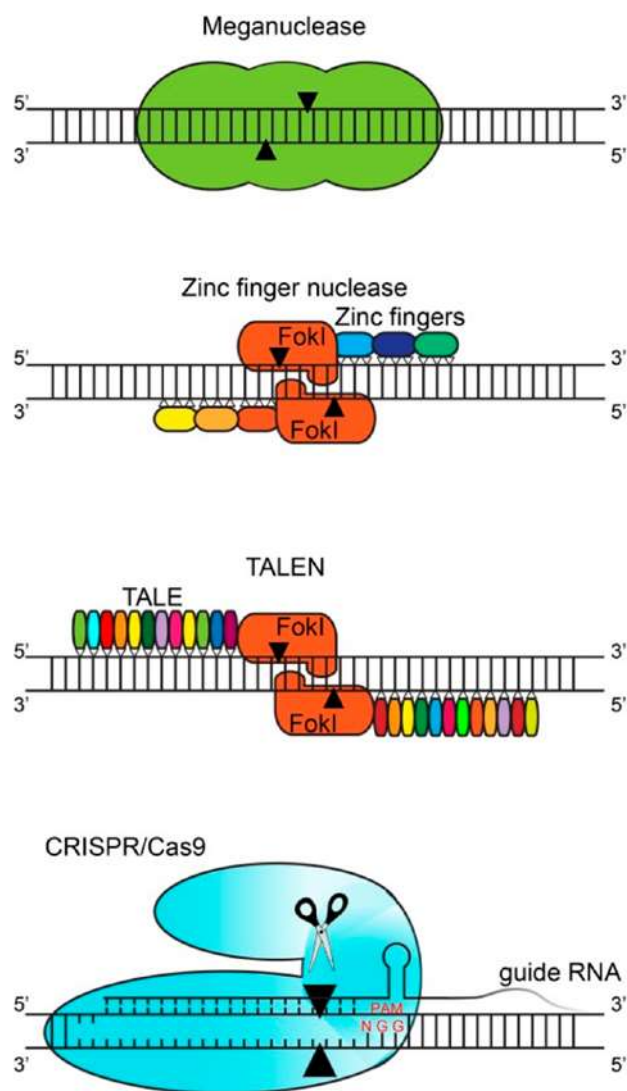


Рис. 1.3 – Системи редагування генів

(Джерело: CRISPR/Cas Derivatives as Novel Gene Modulating Tools: Possibilities and In Vivo Applications, Xingbo Xu et al., 2020)

Інструменти для редагування геномів (системи цинкових пальців ZFN, TALEN, CRISPR/Cas) створюють подвійний розрив ДНК у цільових генах. Відновлення пошкодженої ДНК відбувається через негомологічне з'єднання кінців, схильне до помилок, або гомологічно спрямоване відновлення. ZFN і TALEN представляють собою штучні рестрикційні ендонуклеази, що використовують ДНК-домени «цинкових пальців» та TAL-домени для розрізання специфічних ДНК-мішеней. Але ці технології мають недоліки,

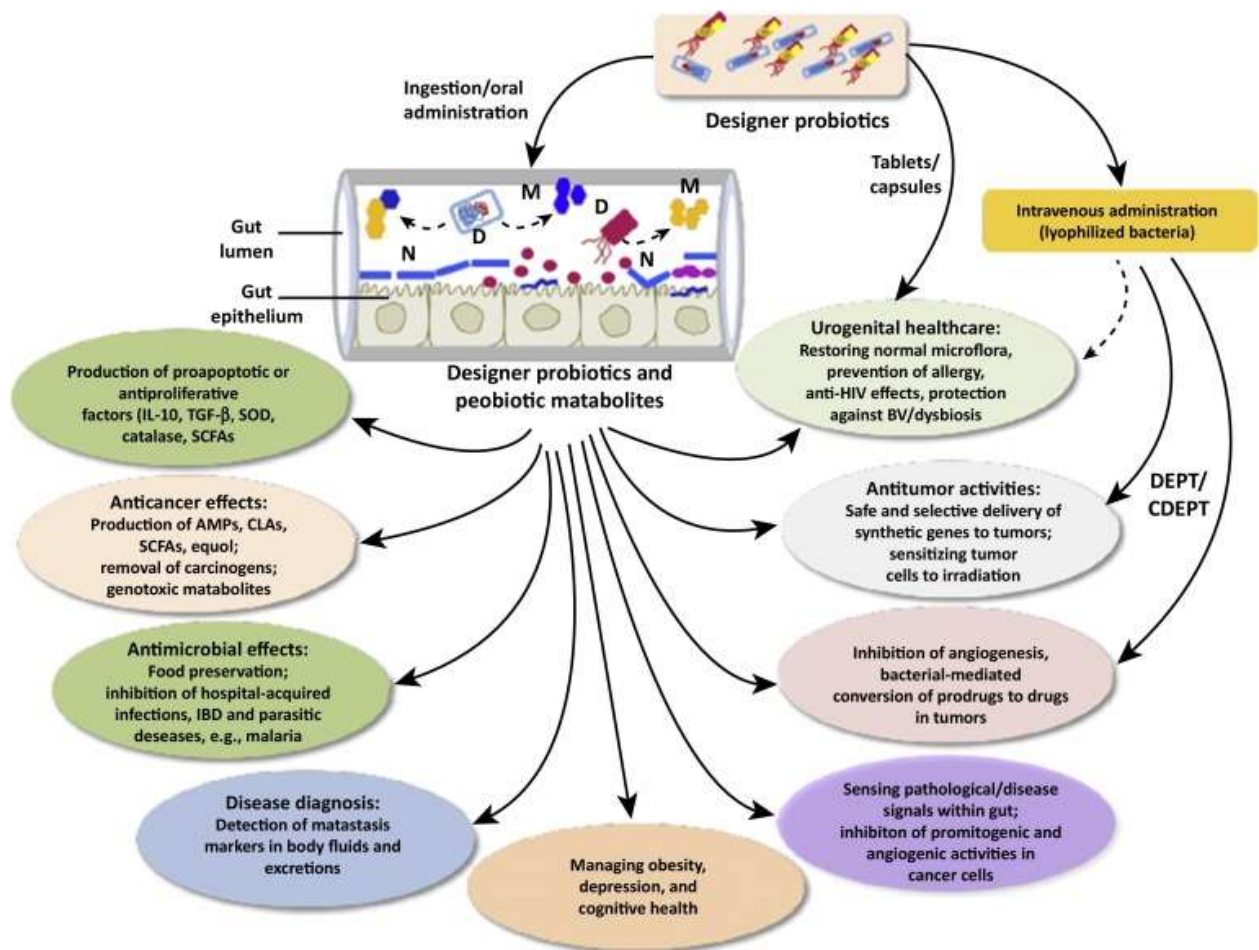
зокрема низьку специфічність ZFN та ризик нецільових мутацій, а також складність і трудомісткість процесу створення стандартних ZFN і TALEN. Хоча ZFN і TALEN застосовувалися для редагування генів клітин людини, тварин і рослин з 2002 і 2011 років відповідно, вказані обмеження значно стримували їх широке впровадження.

З 2012 року дослідники активно перейшли до використання технології CRISPR, яка має високу ефективність редагування, простоту та гнучкість у застосуванні, відкриваючи нові можливості у редагуванні генів.

CRISPR та споріднені білки Cas є частиною бактеріальної імунної системи, яка захищає бактерії від фагів. Бактерії інтегрують послідовності генів вірусу, що вторгнувся, у свій CRISPR-спейсер. Під час повторного вторгнення вірусу CRISPR транскрибується у попередника CRISPR РНК (pre-crRNA), який далі перетворюється у crRNA. CrRNA розпізнає гомологічні послідовності вірусного геному, зв'язується з ними та активує білки Cas, які розщеплюють вірусні гени.

На сьогодні завдяки розвитку технологій рекомбінантних ДНК створено рекомбінантні пробіотики з різними терапевтичними ефектами та з різним застосуванням (рис. 1.4): для продукування ефективних антимікробних пептидів, із посиленою стійкістю до стресових факторів, із протираковою активністю, психобіотики, що впливають на когнітивні функції завдяки здатності виробляти нейроактивні молекули, з ефективністю продукувати противірусні пептиди, зокрема проти ВІЛ, для стимулювання імунної відповіді тощо.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
|      |      |          |        |      |                     |      |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 12   |



Trends in Biotechnology

Рис. 1.4 – Нові підходи у розробці пробіотиків

(Джерело: Designer Probiotics: Paving the Way to Living Therapeutics, Singh B., 2017)

|      |      |          |        |      |
|------|------|----------|--------|------|
|      |      |          |        |      |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |

162.01.14.00 000 ПЗ

Арк.

13

## 2 ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОГО ПРОДУКТУ, СИРОВИНИ, МАТЕРІАЛІВ, НАПІВПРОДУКТІВ

### 2.1 Характеристика готового продукту

Готовий продукт – рекомбінантний пробіотик на основі штаму *B. bifidum* BGN4 [pBESIL10] у вигляді ліофілізованого порошку у флаконах 5 мл.

Органолептичні властивості:

кристалічний, пористий порошок, блідо-бежевого кольору, зі специфічним смаком та запахом; розчинний; рН 5,3-6,7.

Склад препарату:

*B. bifidum* BGN4 – не менше  $1 \times 10^7$  КУО (колонієутворюючих одиниць)/мл на кінець строку придатності,

складові живильного середовища,

складові захисного середовища: сахарози – 7-10 %, желатини – 0,7-1,5 %, молока знежиреного – 15-25 %.

Застосування:

лікарський засіб має багатфакторний механізм дії, включаючи посилене продукування ІЛ-10 як основного супресора запальної імунної відповіді в різних клітинах, тим самим має імуномодулюючу дію, ефективний лікуванні аутоімунних захворювань людини, таких як запальне захворювання кишечника, рак, ревматоїдний артрит, хвороба Крона, а також у профілактиці ожиріння та алергії; проявляє антагоністичну активність проти широкого спектра патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, зокрема шигел, сальмонел, протей. Сприяє відновленню бактеріального балансу кишечника та стимулює місцеві репаративні процеси. Препарат застосовують для лікування кишкових дисфункцій, спричинених дисбактеріозами різного походження, хронічними колітами, а також у післяінфекційних станах, що супроводжуються виділенням патогенних бактерій. Крім того, його

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 14   |

використовують у складі комплексної терапії гострих кишкових інфекцій, аутоімунних запальних захворювань.

Показники якості готового препарату повинні бути винесенні у специфікацію, перелік показників повинен відповідати вимогам ДФУ 2.5 загальної монографії «Живі біотерапевтичні лікарські засоби» та ДФУ 2.6 загальної монографії «Лікарські засоби, одержувані за допомогою технології рекомбінантної ДНК», додатково повинна бути перевірена кількість секретованого людського ІЛ-10 за допомогою ELISA.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
|      |      |          |        |      |                     |      |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 15   |

## 2.2 Характеристика сировини

У цій роботі пропонується організація виробництва рекомбінантного пробіотику на основі штаму *B. bifidum* BGN4 [pBESIL10]. На стадіях вирощування культури пропонується використовувати типове для біфідобактерій середовище, яке показує високі виходи біомаси. Компоненти середовища та інші речовини, необхідні для виробництва рекомбінантного пробіотику у вигляді ліофілізованої біомаси у флаконах наведено у табл. 2.1. Постачальниками компонентів для живильного середовища та реагентів є підприємства харчової промисловості Харкова (м'ясокомбінат, дріжджовий завод, молочний комбінат) та фармацевтичні компанії України. Для санітарної обробки обладнання, інвентарю та приміщень, знезараження фільтрів, приготування дезінфікуючих та антисептичних розчинів, підготовки флаконів, пробок, ковпачків використовують наступні допоміжні матеріали: перекис водню, сірчана кислота, сода кальцинована технічна, спирт етиловий, формалін, хлорамін, молочна кислота, мурашина кислота, миючі засоби синтетичні порошкоподібні та інвентар для прибирання і одноразові гігієнічні засоби. Для упакування, підготовки матеріалу до стерилізації, фільтрації, проведення санітарної обробки приміщень та інших допоміжних операцій процесу потрібні: алігнін медичний, картон для споживчої тари, пачки, фарба глибокого друку, папір мішковий, папір обгортковий, папір фільтрувальний, плівка целюлозна, бельтинг фільтрувальний, папір етикеточний, батист, вата медична гігроскопічна, марля медична, ковпачки алюмінієві, пробки до флаконів, флакони, ящик із гофрованого картону.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
|      |      |          |        |      |                     | 16   |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     |      |

Таблиця 4.1 – Характеристика сировини

| Найменування                        | Категорія і номер НТД              | Показники перевірки                                                               | Примітка                               |
|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Основна сировина                    |                                    |                                                                                   |                                        |
| Казеїн харчовий                     | ДСТУ 6031:2008                     | Зовнішній вигляд, вміст жиру, маркування, сертифікат постачальника                | Для приготування живильного середовища |
| Дріжджі хлібопекарські              | ДСТУ 4657:2006                     | Зовнішній вигляд, запах, маркування, сертифікат постачальника                     | Для приготування живильного середовища |
| Натрію хлорид                       | ДСТУ ISO 2479-2001                 | Зовнішній вигляд, вміст основної речовини, маркування, сертифікат постачальника   | Для приготування живильного середовища |
| Агар-агар або агар мікробіологічний | ГОСТ 17206-84                      | Зовнішній вигляд, запах, колір, кислотність, маркування, сертифікат постачальника | Для приготування живильного середовища |
| Печінка ВХР                         | Сертифікат та гігієнічний висновок | Без сторонніх запахів та видимих змін, сертифікат постачальника                   | Для приготування живильного середовища |

|                                              |                                                                   |                                                                                                   |                                                 |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|                                              | постачаль<br>ника                                                 |                                                                                                   |                                                 |
| Пептон<br>бактеріологічний<br>ферментативний | ГОСТ<br>13805-76                                                  | Зовнішній<br>вигляд,<br>маркування,<br>сертифікат<br>постачальника                                | Для<br>приготування<br>поживних<br>середовищ    |
| Лактоза (молочний<br>цукор)                  | ДСТУ<br>4873:2007                                                 | вміст основної<br>речовини,<br>домішки,<br>маркування,<br>сертифікат<br>постачальника             | Для<br>приготування<br>живильного<br>середовища |
| L-цистеїн                                    | Сертифіка<br>т<br>постачаль<br>ника                               | Вміст основної<br>речовини,<br>домішки,<br>сертифікат<br>постачальника                            | Для<br>приготування<br>живильного<br>середовища |
| Хлороформ                                    | ГОСТ<br>20015-88                                                  | зовнішній вигляд,<br>щільність,<br>домішки,<br>маркування,<br>сертифікат<br>постачальника         | Для<br>приготування<br>живильного<br>середовища |
| Підшлункова яловича<br>залоза                | Сертифіка<br>т та<br>гігієнічний<br>висновок<br>постачаль<br>ника | Зовнішній<br>вигляд,<br>консистенція,<br>колір, сертифікат<br>постачальника                       | Для отримання<br>гідролізату<br>казеїну         |
| Желатин                                      | ГОСТ<br>11293-89                                                  | Зовнішній<br>вигляд, розмір<br>частинок,<br>домішки,<br>щільність,<br>сертифікат<br>постачальника | Для<br>приготування<br>захисного<br>середовища  |

|                                         |                       |                                                                                                                          |                                                                                    |
|-----------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Сахароза                                | ДСТУ<br>4623:2023     | Молекулярна<br>маса, питоме<br>обертання,<br>маркування,<br>сертифікат<br>постачальника                                  | Для<br>приготування<br>захисного<br>середовища                                     |
| Молоко знежирене                        | ДСТУ ISO<br>7208:2002 | Жирність,<br>зовнішній вигляд,<br>маркування,<br>сертифікат<br>постачальника                                             | Для<br>приготування<br>захисного<br>середовища                                     |
| Натрію гідроксид                        | ДСТУ ISO<br>3196-2001 | Зовнішній<br>вигляд, вміст<br>основної<br>речовини,<br>маркування,<br>сертифікат<br>постачальника                        | Для<br>приготування<br>робочого<br>розчину для<br>регулювання<br>рН                |
| Вода водопровідна                       | ДСТУ<br>7525:2014     | Зовнішній<br>вигляд, рН,<br>жорсткість,<br>мікробна чистота                                                              | Для<br>приготування<br>живильного<br>середовища,<br>для отримання<br>води очищеної |
| Вода очищена                            | ДФУ                   | Зовнішній<br>вигляд, питома<br>електропровідніс<br>ть, важкі метали,<br>бактеріальні<br>ендотоксини,<br>мікробна чистота | Для<br>приготування<br>середовищ,<br>миття посуду,<br>інвентаря                    |
| Напівпродукти                           |                       |                                                                                                                          |                                                                                    |
| Казеїново-дріжджове<br>середовище (КДС) | НТД<br>виробника      | Вміст амінного<br>азоту, рН,<br>стерильність                                                                             | Середовище<br>для<br>виращування                                                   |

|                                      |                  |                                        |                            |
|--------------------------------------|------------------|----------------------------------------|----------------------------|
| Середовище Блаурока                  | НТД<br>виробника | Вміст амінного азоту, рН, стерильність | Середовище для вирощування |
| Сахарозо-желатинове середовище (СЖС) | НТД<br>виробника | Вміст амінного азоту рН, стерильність  | Середовище для вирощування |

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
|      |      |          |        |      |                     |      |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 20   |

## 2.3 Характеристика біологічного об'єкту

Серед можливих застосувань, які враховуються у сучасному дизайні пробіотиків та розглянутих у розділі 1, перспективним у сучасних українських реаліях буде стимуляція потужної імунної відповіді. Слід згадати, що одним із природніх механізмів дії пробіотиків є продукування ними імуногенних молекул для активації гуморальної та опосередкованою з клітиною відповідей. Рекомбінантні пробіотики є ідеальним об'єктом для посилення імуномодуляції та цитозахисту в організмі людини, так як протягом еволюції утворився стійкий зв'язок між клітинами господаря та клітинами мікрофлори, які колонізують слизові, таким чином посилюючи контакт між імунною системою та антигеном. У цьому контексті можна сказати, що рекомбінантні пробіотики, створенні на основі природних популяцій мікрофлори, будуть слугувати ідеальним вектором.

Як основою для організації виробництва рекомбінантного пробіотичного препарату обрано біфідобактерії, які вже багато років використовуються у складі різноманітних лікарських засобів та дієтичних добавок. *Bifidobacterium* spp. є грампозитивними, анаеробними, природними мікроорганізмами, які швидко колонізують товстий кишечник немовлят, що годуються грудьми, вони відносяться до ферментативних бактерій, які отримали комерційний і науковий інтерес. Різні штами біфідобактерій мають наступні доведені корисні для здоров'я властивості: лікування та профілактика шлунково-кишкових розладів, зниження непереносимості лактози, захист від патогенів, посилення імунної системи, профілактика раку, посилення функції клітинного бар'єру, кишкові імуномодулюючі ефекти, виробництво антимікробних речовин, профілактика ожиріння та алергії.

Отже, біфідобактерії є представниками мікробіому людини, є безпечними та з доведеною ефективністю дії через багатфакторний механізм впливу. Крім цього, технології виробництва пробіотиків на основі

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 21   |

біфідобактерій є відпрацьованими, зокрема і вітчизняними виробниками, та реалізація цієї технології на українських підприємствах не буде викликати труднощів, незважаючи на анаеробність вихідних штамів.

Серед різних штамів *Bifidobacterium sp.* для створення рекомбінантних пробіотиків увага багатьох дослідників зосередження на *B. bifidum* BGN4 через його доведені *in vitro* та *in vivo* пробіотичні функції, такі як висока адгезія бактеріальних клітин до клітин товстої кишки, модуляторний вплив на клітини макрофагів та інші імунні клітини, протиалергічні реакції на мишачих моделях, лікування протизапальних захворювань кишечника, інгібування росту клітинної лінії раку.

Важливість адгезивних властивостей для пробіотичних штамів є очевидною, так як саме вона обумовлює довготривале перебування клітини на клітинах слизових оболонок з можливістю продукування біоактивних молекул, корисних для господаря, та перешкоджає колонізації слизових людини патогенними бактеріями. Ця здатність клітинної адгезії розглядається як один із критичних стандартів скринінгу для активних пробіотичних штамів, оскільки адгезія необхідна для активної проліферації та забезпечення стійкості до виведення з кишкового тракту у вигляді відходів за допомогою перистальтики.

Механізми бактеріальної адгезії на епітеліальних клітинах можна розділити на: неспецифічну адгезію щодо фізико-хімічних факторів зовнішньої клітинної поверхні; та специфічну адгезію, коли розглядається експресія специфічних молекул на мікробних мембранах, які безпосередньо прикріплюються до місць зв'язування поверхонь слизової оболонки епітеліальних клітин. Доведено, що штам *B. bifidum* BGN4 має високу адгезію до епітеліальних клітин (рис. 2.1), що обумовлює популярність цього штаму для розробників та виробників.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
|      |      |          |        |      |                     | 22   |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     |      |

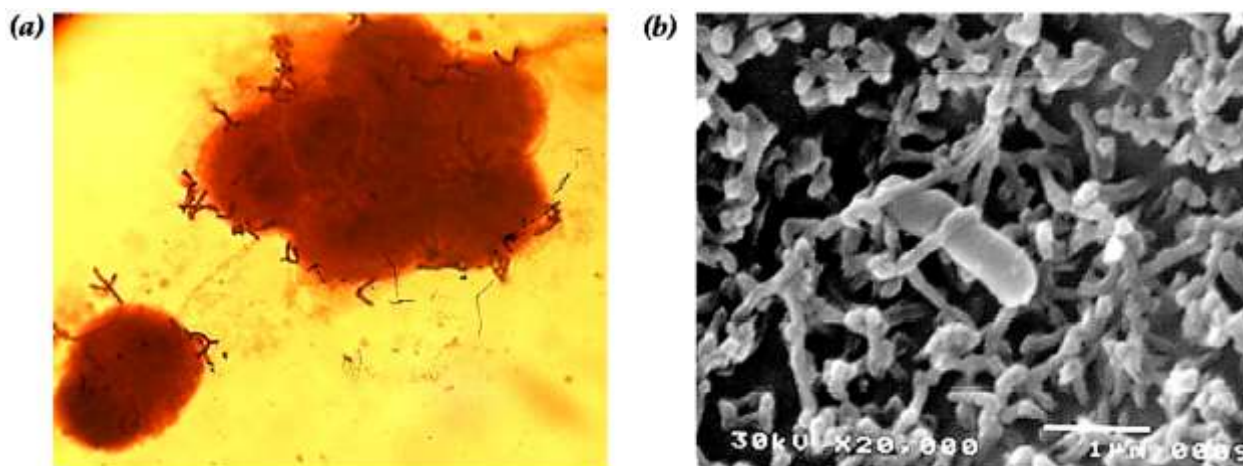


Рис. 2.1 - Адгезія *B. bifidum* BGN4 до епітеліальних клітин:

а. оптична мікроскопія (збільшення 1000 ×);

б. скануюча електронна мікроскопія (збільшення 20 000×)

(Джерело: Review on *Bifidobacterium bifidum* BGN4: Functionality and Nutraceutical Applications as a Probiotic Microorganism, Seockmo Ku et al., 2016)

Крім того, *B. bifidum* BGN4 позначений як загальновизнаний безпечний (GRAS) і сертифікований FDA США, тому він вважається безпечним для експресії та доставки біологічно активних генів для людини.

Однак, як відмічають розробники рекомбінантних штамів на основі біфідобактерії, зокрема і вихідного штаму *B. bifidum* BGN4, однією з головних проблем при її трансформації є те, що як грампозитивна клітина вона має товсті клітинні стінки, що знижує ефективність трансформації. Для подолання цієї проблеми використовують оптимізовані умови електропорації з обробкою GrC-метилтрансферазою та ослаблення клітинної стінки за допомогою хлориду натрію. За допомогою використання цих оптимізованих умов у *B. bifidum* BGN4 було уведено гени біфідобактеріальної β-галактозидази, що використовується для зниження лактози в молоці, та β-глюкозидаза - для перетворення ізофлавонових глюкозидів, дисахаридів і гінзенозидів.

Використовуючи цей метод у 2021 р. Nayoun Hong та ін. розробили рекомбінантний штам *B. bifidum* BGN4 [pBESIL10] для ефективної доставки

людського інтерлейкіна IL-10 у кишечник, який є протизапальним цитокіном та має множинні плейотропні впливи на імунорегуляцію та запалення.

IL-10 людини є нековалентним гомодимером у своїй біологічно активній формі, який дисоціює на стабільний, але неактивний мономер при рН нижче 5,5. IL-10 діє як основний супресор імунної відповіді в макрофагах та інших антигенпрезентуючих клітинах (APC), пов'язаних з індукцією передачі сигналу та активацією фосфорилування транскрипції 3 (STAT3). IL-10 націлений на різноманітні клітини та діє як протизапальний цитокінін (рис. 2.2 та 2.3).

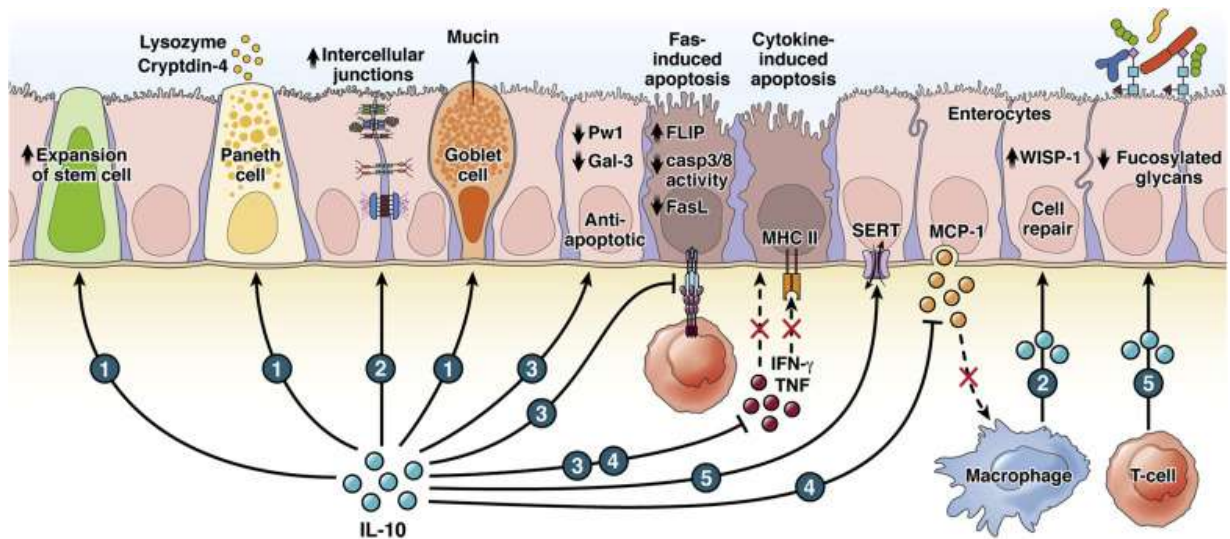


Рис. 2.2 - IL-10 тканини Lamina propria на кишковий епітелій

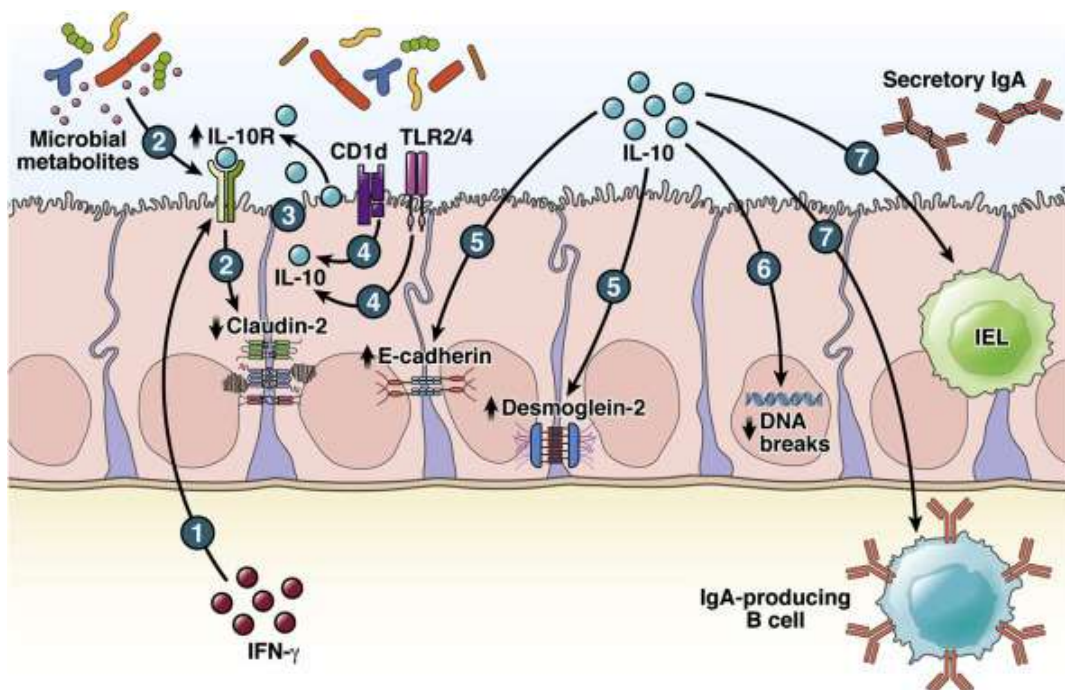


Рис. 2.3 – Потенційна роль епітеліального IL-10

(Джерело рис. 2.1 та 2.2 та деталі: The Production and Function of Endogenous Interleukin-10 in Intestinal Epithelial Cells and Gut Homeostasis, Huong D. Nguyen, 2021)

Також відомо, що IL-10 індукує проліферацію епітеліальних клітин, сприяє загоєнню ран і відіграє важливу роль у кишковому гомеостазі завдяки своїй протизапальній активності, обмежує термогенез і витрату енергії, а також зменшує запальні реакції в адипоцитах. IL-10 має потенціал для лікування раку та аутоімунних захворювань людини, таких як запальне захворювання кишечника і ревматоїдний артрит. Таким чином, використання розробленого рекомбінантного штаму *B. bifidum* BGN4 [pBESIL10] у складі пробіотичного препарату сприятиме розвитку потужної імунної відповіді у хазяїна.

Розробники сконструювали вектор pBESIL10 (рис. 2.4) шляхом клонування гена IL-10 людини під промотором *gar* та сигнальним пептидом *Bifidobacterium* spp. у човниковий вектор *E. coli-Bifidobacterium* pBES2. Послідовність промотора гена *gar* отримана з бази даних геному *Bifidobacterium longum* (GenBank AD052817). Ген сигнального пептиду

отриманий з *Bifidobacterium bifidum* S17 (GenBank NC\_014616.1). Цільові фрагменти гена hIL-10 були оптимізовані за кодоном для *Bifidobacterium bifidum*. Вектор pBES2 використовували для човникового вектора між *E. coli* та *B. bifidum*. Вектор pBES2 сконструйований із криптичної плазмиди pMG1 з *Bifidobacterium longum* MG1, лігваної з pUC19, і мав маркери стійкості до ампіциліну та хлорамфеніколу. pBES2 розрізали за допомогою Xba I та Acc 65I. Промотор із сигнальним пептидом і hIL10 ORF з термінатором ампліфікували за допомогою ПЛР і з'єднали з вектором pBES2 за допомогою ПЛР з клонуванням. Плазмідну ДНК, екстраговану з *E. coli* DH5 $\alpha$ , метилювали GpC метилтрансферазами і очищали.

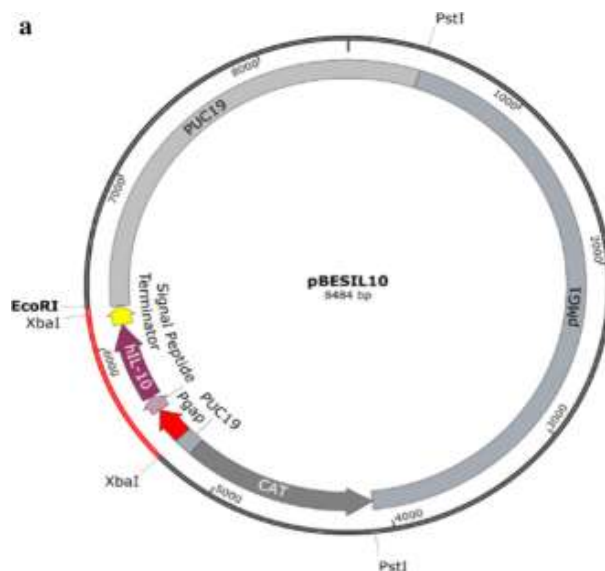


Рис. 2.4 – Структура плазмиди pBESIL10:

pBESIL10 сконструйовано з P- розривом (промотор gar), сигнальним пептидом гена bbif\_1761, hIL-10 (ген ORF інтерлейкіну-10 людини), оптимізованим для *Bifidobacterium bifidum*, і термінатором у pBES2. CmR і AmpR - гени стійкості до хлорамфеніколу та ампіциліну; Ori - джерело реплікації з pUC19 ; Mob і Rep - плазмідні кодовані білком MG1 з *Bifidobacterium longum* MG1

(Джерело: Production of biologically active human interleukin-10 by *Bifidobacterium bifidum* BGN4, Nayoun Hong et al., 2021)

Розробники штаму провели оцінку рівня експресії білка та оцінку його активності, що показали високі результати. Так, культура *B. bifidum* BGN4

[pBESIL10] виробляє  $1473 \pm 300$  нг/мл людського ІЛ-10, що є найвищим серед інших подібних розробок (табл. 2.2).

Таблиця 2.2 – Порівняння рівня експресії ІЛ-10 рекомбінантними пробіотиками

| Рекомбінантний штам      | Білок         | Вектор                          | Промоутер                          | Кількість білка, що експресується, нг/мл |
|--------------------------|---------------|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------|
| <i>L. lactis</i> Thy12   | ІЛ-10 людини  | Інтегрована хромосома           | P <sub>thyA</sub> (конститутивний) | 13,7                                     |
| <i>L. lactis</i>         | Мишачий ІЛ-10 | pLB263                          | P <sub>groESL</sub> (індукований)  | 40,72                                    |
| <i>L. lactis</i> MG1363  | Мишачий ІЛ-10 | pT1MIL10                        | P1 (конститутивний)                | 630                                      |
| <i>B. longum</i> NCC2705 | ІЛ-10 людини  | pLR                             | P <sub>hup</sub> (конститутивний)  | 22                                       |
| <i>B. breve</i> UCC2003  | ІЛ-10 людини  | pESH100                         | P <sub>gap</sub> (конститутивний)  | 1,9                                      |
| <i>B. bifidum</i> BS42   | Мишачий ІЛ-10 | pBEST <sub>Exp4</sub> : ІЛ-10   | P <sub>dnaK</sub> (конститутивний) | 7                                        |
| <i>B. bifidum</i> BS42   | Мишачий ІЛ-10 | pBEST <sub>SP1181</sub> : ІЛ-10 | P <sub>dnaK</sub> (конститутивний) | 24                                       |
| <i>B. bifidum</i> 4 лв   | ІЛ-10 людини  | pBESIL10                        | P <sub>gap</sub> (конститутивний)  | 1473                                     |

Таким чином, використання рекомбінантного штаму у *B. bifidum* BGN4 [pBESIL10] для доставки людського ІЛ-10 до кишечника господаря є перспективним.

## 2.4 Біосинтез цільового продукту

Цільовим продуктом у цій роботі виступає ліофілізована біомаса біфідобактерій на основі рекомбінантного штаму *Bifidobacterium bifidum* BGN4 [pBESIL10], який виробляє різноманітні метаболіти, характерні як для вихідного штаму біфідобактерій, так і продукти експресії уведеного гену.

Як представник виду *B. bifidum* штам має особливий шлях метаболізму – гетероферментативного молочнокислого бродіння (рис. 2.5), кінцевими продуктами якого є лактат та ацетат; протягом різноманітних реакцій метаболізму утворюються коротколанцюгові жирні кислоти, гама-аміномасляна кислота, полісахариди та їх попередники. Крім цього, біфідобактерії характеризуються біосинтезом антимікробних пептидів та інших корисних сполук. Основною сполукою, що є цікавою у цій роботі, є інтерлейкін IL-10, що синтезується рекомбінантним штамом *B. bifidum* BGN4 після його модифікації. Біосинтез інтерлейкіну пов'язаний із взаємодією між кишковою мікробіотою, кишковими епітеліальними клітинами та дендритними клітинами слизової оболонки, штам потенційно стимулює імунну модуляцію через взаємодію дендритних клітин у гомеостазі кишечника. Біфункціональні властивості цього штаму були підсумовані та наведені на рис. 2.6.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
|      |      |          |        |      |                     | 28   |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     |      |

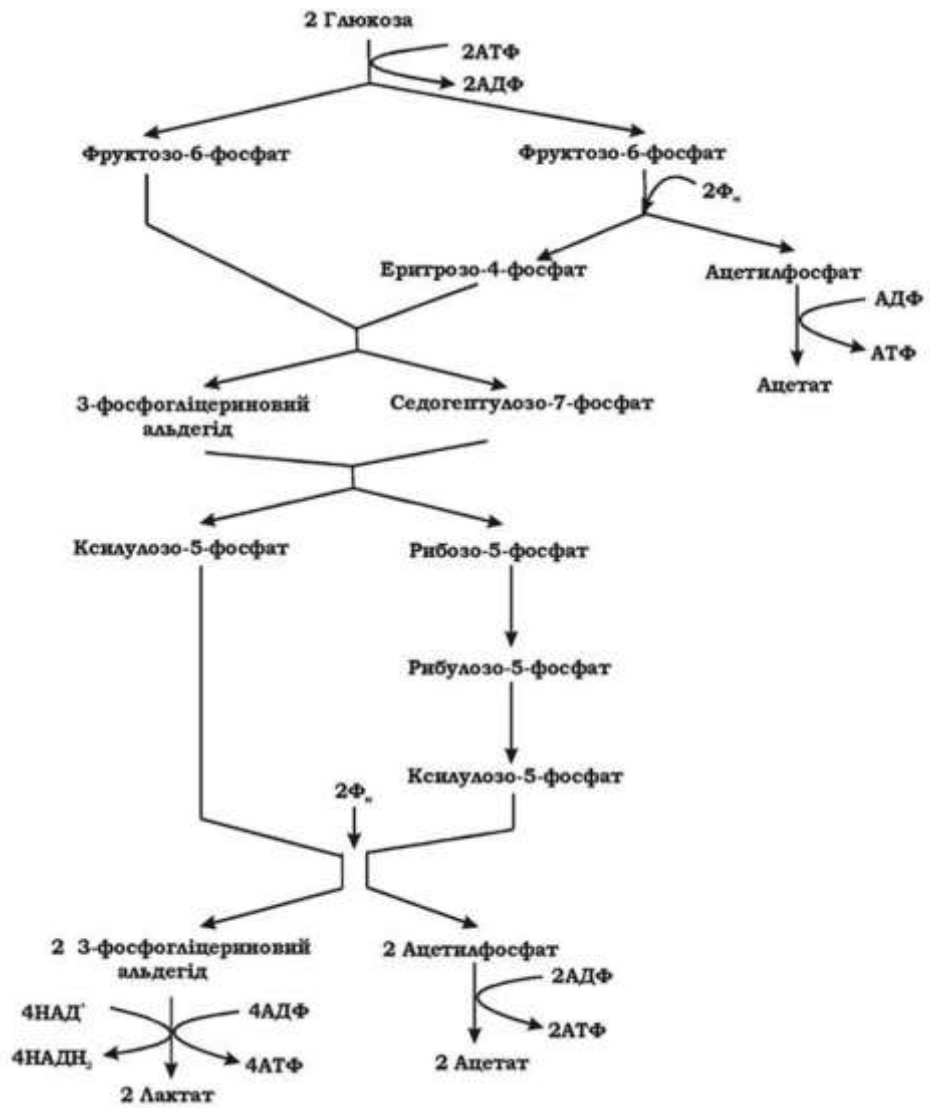


Рис. 2.5 – Особливий шлях гетероферментативного молочнокислого бродіння в клітинах *B. bifidum*

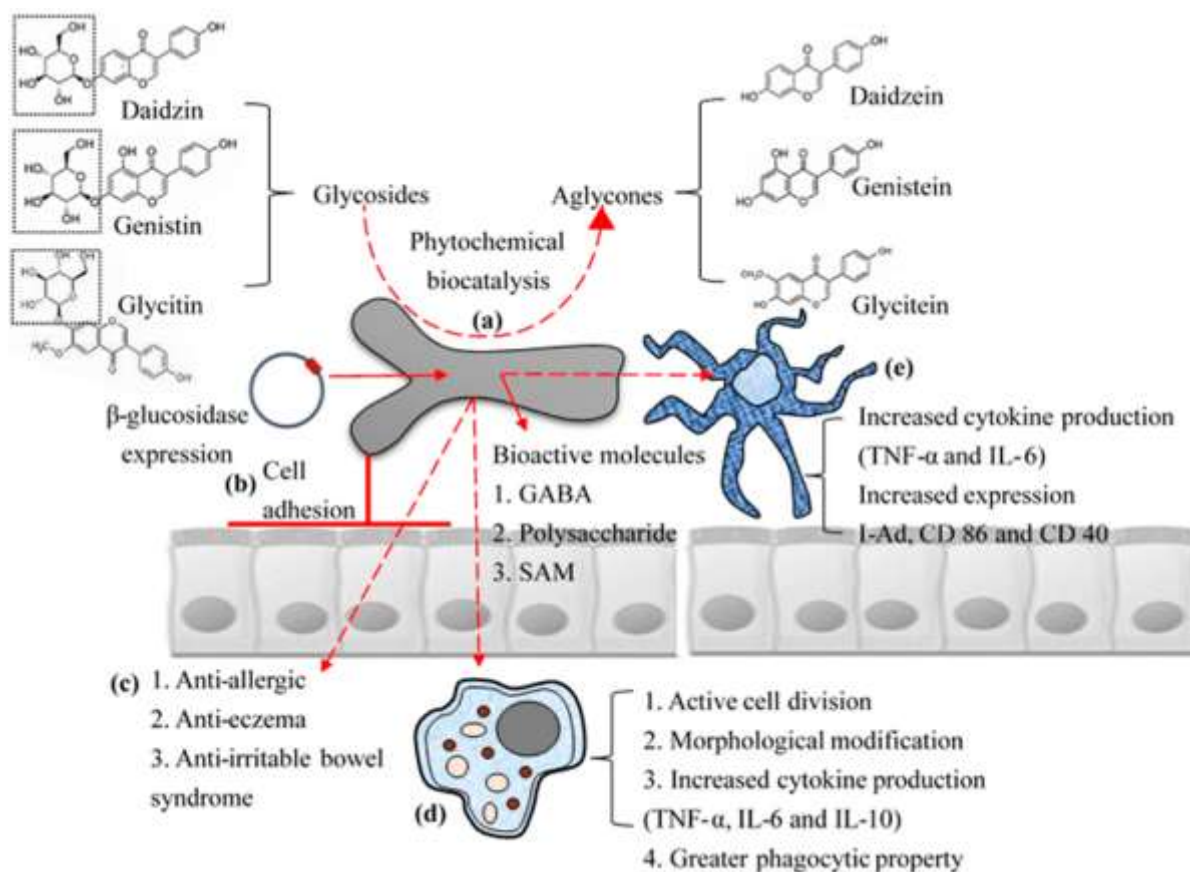


Рис. 2.6 - Схематичне зображення біофункціональних властивостей штаму *B. bifidum* BGN4:

а - біотрансформація фітохімічних речовин; б - висока властивість клітинної адгезії з високою поверхневою гідрофобністю; с - прямий муномодулюючий ефект; d - непрямий імуномодулюючий ефект через активацію макрофагів; е - непрямий імуномодулюючий ефект через активацію дендритних клітин  
(Джерело: Review on *Bifidobacterium bifidum* BGN4: Functionality and Nutraceutical Applications as a Probiotic Microorganism, Seockmo Ku et al., 2016)

## 3 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

### 3.1 Розрахунок матеріального балансу

Матеріальний баланс розраховано на 1 серію препарату, яка складає 13,5 тис. доз (13,5 л) у флаконах по 5 мл, що складає 2700 флаконів (табл. 3.1).

Враховуючи коефіцієнти витрат, для кожної стадії було розраховано кількість речовин, що витрачено та отримано, враховуючи втрати.

Коефіцієнти витрат: стадія 1 - 1,05, стадія 2 - 1,87, стадія 3 - 1,11, стадія 4 - 1,14, стадія 5 - 1,125, стадія 6 - 1,8, стадія 7 - 1,01, стадія 8 - 1,01, стадія 9 - 1,02, стадія 10 - 1,01, стадія 11 - 1,07.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
|      |      |          |        |      |                     |      |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 31   |

Таблиця 3.1 – Матеріальний баланс на 1 серію виробництва препарату

| Назва сировини                                     | Вміст речовини, % | Витрачено та отримано |                   |         |          |               |
|----------------------------------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|---------|----------|---------------|
|                                                    |                   | Маса, кг              |                   |         | Об'єм, л | Кількість, шт |
|                                                    |                   | загальна              | Основної речовини | Кг/моль |          |               |
| 1                                                  | 2                 | 3                     | 4                 | 5       | 6        | 7             |
| Витрачено на стадії 1                              |                   |                       |                   |         |          |               |
| Сировина:                                          |                   |                       |                   |         |          |               |
| Натрію гідроксиду                                  |                   | 0,038                 |                   |         |          |               |
| Вода очищена                                       |                   | 0,22                  |                   |         | 0,22     |               |
| Всього:                                            |                   | 0,258                 |                   |         |          |               |
| Отримано на стадії 1                               |                   |                       |                   |         |          |               |
| Напівпродукти:                                     |                   |                       |                   |         |          |               |
| Розчин натрію гідроксиду                           | 20                | 0,246                 |                   |         | 0,20     |               |
| Втрати:                                            |                   |                       |                   |         |          |               |
| Технологічні та для контролю                       |                   | 0,012                 |                   |         | 0,02     |               |
| Всього:                                            |                   | 0,258                 |                   |         |          |               |
| Витрачено на стадії 2                              |                   |                       |                   |         |          |               |
| Сировина:                                          |                   |                       |                   |         |          |               |
| Печінка ВРХ                                        |                   | 2,2                   |                   |         |          |               |
| Вода очищена                                       |                   | 2,6                   |                   |         | 2,6      |               |
| Пептон мікробіологічний                            |                   | 0,022                 |                   |         |          |               |
| Агар-агар мікробіологічний                         |                   | 0,0024                |                   |         |          |               |
| Натрію хлорид                                      |                   | 0,0125                |                   |         |          |               |
| Лактоза                                            |                   | 0,025                 |                   |         |          |               |
| Цистеїн                                            |                   | 0,0002                |                   |         |          |               |
| Напівпродукти:                                     |                   |                       |                   |         |          |               |
| Розчин натрію гідроксиду                           | 20                | 0,125                 |                   |         | 0,1      |               |
| Всього:                                            |                   | 4,895                 |                   |         |          |               |
| Отримано на стадії 2                               |                   |                       |                   |         |          |               |
| Напівпродукти:                                     |                   |                       |                   |         |          |               |
| Середовище Блаурока                                |                   | 2,623                 |                   |         | 2,3      |               |
| Втрати:                                            |                   |                       |                   |         |          |               |
| Технологічні та для контролю – екстракт печінки    |                   | 0,116                 |                   |         | 0,1      |               |
| Технологічні та для контролю - середовище Блаурока |                   | 0,229                 |                   |         | 0,2      |               |

|                                                               |  |         |  |  |       |  |
|---------------------------------------------------------------|--|---------|--|--|-------|--|
| Відходи:                                                      |  |         |  |  |       |  |
| Залишки розділеної печінки                                    |  | 0,33    |  |  |       |  |
| Залишки вареної печінки                                       |  | 1,7     |  |  |       |  |
| Всього:                                                       |  | 4,895   |  |  |       |  |
| Витрачено на стадії 3                                         |  |         |  |  |       |  |
| Сировина:                                                     |  |         |  |  |       |  |
| Казеїн                                                        |  | 0,43    |  |  |       |  |
| Підшлункова залоза                                            |  | 0,72    |  |  |       |  |
| Хлороформ                                                     |  | 0,151   |  |  | 0,102 |  |
| Вода очищена                                                  |  | 9,809   |  |  | 9,808 |  |
| Дріжджі                                                       |  | 0,37    |  |  |       |  |
| Натрію хлорид                                                 |  | 0,0476  |  |  |       |  |
| Лактоза                                                       |  | 0,094   |  |  |       |  |
| Агар-агар                                                     |  | 0,00476 |  |  |       |  |
| Цистеїн                                                       |  | 0,0094  |  |  |       |  |
| Напівпродукти:                                                |  |         |  |  |       |  |
| Розчин натрію гідроксиду                                      |  | 0,113   |  |  | 0,09  |  |
| Всього:                                                       |  | 11,7587 |  |  |       |  |
| Отримано на стадії 3                                          |  |         |  |  |       |  |
| Напівпродукти:                                                |  |         |  |  |       |  |
| Середовище казеїнове-дріжджове                                |  | 10,6    |  |  | 9,5   |  |
| Втрати:                                                       |  |         |  |  |       |  |
| Технологічні та для контролю - гідролізат казеїну             |  | 0,109   |  |  | 0,1   |  |
| Технологічні та для контролю - автолізат дріжджів             |  | 0,1007  |  |  | 0,1   |  |
| Технологічні та для контролю - середовище казеїнове-дріжджове |  | 0,21    |  |  | 0,3   |  |
| Відходи:                                                      |  |         |  |  |       |  |
| Залишки розділеної підшлункової залози                        |  | 0,15    |  |  |       |  |
| Залишки вареної підшлункової залози                           |  | 0,5     |  |  |       |  |
| Всього:                                                       |  | 11,7587 |  |  |       |  |

|      |      |          |        |      |
|------|------|----------|--------|------|
|      |      |          |        |      |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |

162.01.14.00 000 ПЗ

Арк.

33

|                                                                |  |       |  |  |     |          |
|----------------------------------------------------------------|--|-------|--|--|-----|----------|
| Витрачено на стадії 4                                          |  |       |  |  |     |          |
| Сировина:                                                      |  |       |  |  |     |          |
| Желатина                                                       |  | 0,144 |  |  |     |          |
| Сахароза                                                       |  | 0,951 |  |  |     |          |
| Вода очищена                                                   |  | 1,6   |  |  | 1,6 |          |
| Всього:                                                        |  | 2,695 |  |  | 1,6 |          |
| Отримано на стадії 4                                           |  |       |  |  |     |          |
| Напівпродукти:                                                 |  |       |  |  |     |          |
| Середовище сахарозно-желатинове                                |  | 2,359 |  |  | 1,4 |          |
| Втрати:                                                        |  |       |  |  |     |          |
| Технологічні та для контролю - сахарозно-желатинове середовища |  | 0,336 |  |  | 0,2 |          |
| Всього:                                                        |  | 2,695 |  |  |     |          |
| Витрачено на стадії 5                                          |  |       |  |  |     |          |
| Напівпродукти:                                                 |  |       |  |  |     |          |
| Виробничий штамп <i>B. bifidum</i> BGN4 (ліофілізат у флаконі) |  |       |  |  |     | 1 флакон |
| Середовище Блаурока                                            |  | 2,62  |  |  | 2,3 |          |
| Всього:                                                        |  | 2,62  |  |  | 2,3 |          |
| Отримано на стадії 5                                           |  |       |  |  |     |          |
| Напівпродукти:                                                 |  |       |  |  |     |          |
| Маткова культура <i>B. bifidum</i> BGN4 у середовищі Блаурока  |  | 2,39  |  |  | 2,1 |          |
| Втрати:                                                        |  |       |  |  |     |          |
| Технологічні та для контролю                                   |  | 0,23  |  |  | 0,2 |          |
| Всього:                                                        |  | 2,62  |  |  | 2,3 |          |
| Витрачено на стадії 6                                          |  |       |  |  |     |          |
| Напівпродукти:                                                 |  |       |  |  |     |          |
| Маткова культура <i>B. bifidum</i> BGN4 у середовищі Блаурока  |  | 2,38  |  |  | 2,1 |          |
| Середовище казеїнове-дріжджове                                 |  | 10,60 |  |  | 9,5 |          |
| Захисне середовище                                             |  | 2,36  |  |  | 1,4 |          |

|                                                        |  |       |  |  |      |      |
|--------------------------------------------------------|--|-------|--|--|------|------|
| (сахарозно-желатинове)                                 |  |       |  |  |      |      |
| Молоко знежирене                                       |  | 2,167 |  |  | 2,1  |      |
| Всього:                                                |  | 17,52 |  |  | 15,1 |      |
| Отримано на стадії 6                                   |  |       |  |  |      |      |
| Напівпродукти:                                         |  |       |  |  |      |      |
| Біомаса <i>B. bifidum</i> BGN4 на розлив               |  | 9,70  |  |  | 14,7 |      |
| Відходи:                                               |  |       |  |  |      |      |
| Банки із середовищами Блаурока та казеїново-дріжджовим |  | 7,00  |  |  |      |      |
| Втрати:                                                |  |       |  |  |      |      |
| Технологічні та для контролю                           |  | 0,82  |  |  | 0,4  |      |
| Всього:                                                |  | 17,52 |  |  | 15,1 |      |
| Витрачено на стадії 7                                  |  |       |  |  |      |      |
| Сировина та матеріали:                                 |  |       |  |  |      |      |
| Флакони                                                |  |       |  |  |      | 2850 |
| Пробки                                                 |  |       |  |  |      | 2850 |
| Ковпачки                                               |  |       |  |  |      | 2850 |
| Всього:                                                |  |       |  |  |      |      |
| Отримано на стадії 7                                   |  |       |  |  |      |      |
| Матеріали:                                             |  |       |  |  |      |      |
| Флакони                                                |  |       |  |  |      | 2820 |
| Пробки                                                 |  |       |  |  |      | 2820 |
| Ковпачки                                               |  |       |  |  |      | 2820 |
| Втрати:                                                |  |       |  |  |      |      |
| Флакони (при стерилізації)                             |  |       |  |  |      | 30   |
| Пробки (при стерилізації)                              |  |       |  |  |      | 30   |
| Ковпачки (при стерилізації)                            |  |       |  |  |      | 30   |
| Всього:                                                |  |       |  |  |      |      |
| Витрачено на стадії 8                                  |  |       |  |  |      |      |
| Напівпродуктів:                                        |  |       |  |  |      |      |
| Біомаса <i>B. bifidum</i> BGN4 на розлив               |  | 9,70  |  |  | 14,7 |      |
| Матеріали:                                             |  |       |  |  |      |      |
| Флакони                                                |  |       |  |  |      | 2850 |
| Всього:                                                |  | 9,70  |  |  | 14,7 | 2850 |
| Отримано на стадії 8                                   |  |       |  |  |      |      |
| Напівпродукти:                                         |  |       |  |  |      |      |

|                                                                     |  |       |  |  |       |      |
|---------------------------------------------------------------------|--|-------|--|--|-------|------|
| Біомаса <i>B. bifidum</i> BGN4 рідка у флаконах                     |  | 9,50  |  |  | 14,4  | 2820 |
| Втрати:                                                             |  |       |  |  |       |      |
| Флакони                                                             |  |       |  |  |       | 30   |
| Технологічні та для контролю - біомаса <i>B. bifidum</i> BGN4 рідка |  | 0,2   |  |  | 0,3   |      |
| Всього:                                                             |  | 9,70  |  |  | 14,7  | 2850 |
| Витрачено на стадії 9                                               |  |       |  |  |       |      |
| Напівпродукти:                                                      |  |       |  |  |       |      |
| Біомаса <i>B. bifidum</i> BGN4 рідка у флаконах                     |  | 9,50  |  |  | 14,4  | 2850 |
| Всього:                                                             |  | 9,50  |  |  |       |      |
| Отримано на стадії 9                                                |  |       |  |  |       |      |
| Напівпродукти:                                                      |  |       |  |  |       |      |
| Біомаса <i>B. bifidum</i> BGN4 суха у флаконах                      |  | 5,217 |  |  | 14,1  | 2820 |
| Втрати:                                                             |  |       |  |  |       |      |
| Біомаса <i>B. bifidum</i> BGN4 у флаконах при ліофілізації          |  | 0,198 |  |  | 0,3   | 30   |
| Вода при ліофілізації                                               |  | 4,089 |  |  |       |      |
| Всього:                                                             |  | 9,504 |  |  |       | 2850 |
| Витрачено на стадії 10                                              |  |       |  |  |       |      |
| Напівпродукти:                                                      |  |       |  |  |       |      |
| Біомаса <i>B. bifidum</i> BGN4 суха у флаконах                      |  |       |  |  | 14,1  | 2820 |
| Матеріали:                                                          |  |       |  |  |       |      |
| Пробки                                                              |  |       |  |  |       | 2820 |
| Ковпачки                                                            |  |       |  |  |       | 2820 |
| Всього:                                                             |  |       |  |  | 14,1  |      |
| Отримано на стадії 10                                               |  |       |  |  |       |      |
| Напівпродукти:                                                      |  |       |  |  |       |      |
| Біомаса <i>B. bifidum</i> BGN4 суха у флаконах                      |  |       |  |  | 14,0) | 2800 |
| Втрати:                                                             |  |       |  |  |       |      |
| Технологічні та для контролю - біомаса <i>B. bifidum</i> BGN4 суха  |  |       |  |  | 0,1   | 20   |

|                                                                                             |   |  |  |  |      |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|---|--|--|--|------|------|
| Технологічні пробки                                                                         | - |  |  |  |      | 20   |
| Технологічні ковпачки                                                                       | - |  |  |  |      | 20   |
| Всього:                                                                                     |   |  |  |  | 14,1 |      |
| Витрачено на стадії 11                                                                      |   |  |  |  |      |      |
| Напівпродукти:                                                                              |   |  |  |  |      |      |
| Біфідумбактерину сухого у флаконах                                                          |   |  |  |  | 14,0 | 2800 |
| Матеріалів:                                                                                 |   |  |  |  |      |      |
| Пачок                                                                                       |   |  |  |  |      | 280  |
| Етикеток групових                                                                           |   |  |  |  |      | 280  |
| Інструкцій                                                                                  |   |  |  |  |      | 285  |
| Всього:                                                                                     |   |  |  |  | 14,0 |      |
| Отримано на стадії 11                                                                       |   |  |  |  |      |      |
| Готового продукту:                                                                          |   |  |  |  |      |      |
| Біомаса <i>B. bifidum</i> BGN4 суха у флаконах закупорена у флаконах по 5 мл, у т.ч.:       |   |  |  |  | 13,5 | 2700 |
| Біомаса <i>B. bifidum</i> BGN4 суха у флаконах 5 мл                                         |   |  |  |  | 13,5 | 2700 |
| Пачки                                                                                       |   |  |  |  |      | 270  |
| Етикетки                                                                                    |   |  |  |  |      | 270  |
| Інструкції                                                                                  |   |  |  |  |      | 270  |
| Втрати:                                                                                     |   |  |  |  |      |      |
| Технологічні - біомаса <i>B. bifidum</i> BGN4 суха у флаконах закупорена у флаконах по 5 мл |   |  |  |  | 0,5  | 100  |
| Відходи:                                                                                    |   |  |  |  |      |      |
| Пачки                                                                                       |   |  |  |  |      | 10   |
| Етикетки                                                                                    |   |  |  |  |      | 10   |
| Інструкції                                                                                  |   |  |  |  |      | 10   |
| Всього:                                                                                     |   |  |  |  | 14,0 |      |

### 3.2 Розрахунок і вибір обладнання

Обладнанням, яке розраховане у даній роботі, є сублімаційна сушарка.

Сублімаційна сушка (ліофілізація) - це метод видалення вологи з біопрепаратів шляхом заморожування продукту та наступного випаровування льоду (сублімації) у вакуумі. Така технологія дозволяє зберегти біологічну активність пробіотичних мікроорганізмів, їх структуру та стабільність протягом тривалого часу.

Сублімаційні сушарки складаються з наступних основних елементів:

1. Камера сушки – герметичний простір, де відбувається процес сублімації,
2. Полиці з контролем температури – забезпечують рівномірне заморожування та сушку,
3. Вакуумна система – знижує тиск для інтенсифікації процесу випаровування льоду,
4. Конденсатор пари (пастка льоду) – охолоджує та збирає вилучену вологу,
5. Система контролю та керування – забезпечує точне регулювання параметрів процесу.

Існують різні типи сублімаційних сушарок залежно від їх конструкції та принципу роботи:

1. Лабораторні сушарки. Використовуються для дослідницьких і малих серій виробництва. Мають невеликий об'єм та обмежену продуктивність. Приклад: Christ Alpha 1-2 LDplus.

2. Пілотні (напівпромислові) сушарки. Призначені для оптимізації технологічного процесу перед масштабним виробництвом. Мають більший об'єм завантаження. Приклад: Millrock Technology REVO, LyoStar 3.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 38   |

3. Промислові сублімаційні сушарки. Використовуються у фармацевтичному виробництві для серійного випуску ліофілізованих препаратів. Оснащені автоматизованими системами контролю процесу. Приклади: GEA Lyophil, IMA Lyofast, Telstar LyoPharm.

При виборі сушарки для отримання ліофілізованої біомаси пробіотиків у флаконах необхідно враховувати наступні параметри:

1. Об'єм завантаження - визначає кількість флаконів, які можуть одночасно піддаватися сублімації. Для серійного виробництва оптимально використовувати сушарки з об'ємом  $\geq 50$  літрів.

2. Температурний діапазон полиць. Для пробіотиків важливо мати точний контроль температури в межах  $(-50) - (+40)^{\circ}\text{C}$ .

3. Збереження життєздатності бактерій залежить від правильної швидкості заморожування.

4. Рівень вакууму. Оптимальний діапазон: 0,05–0,1 мбар. Дозволяє уникнути термічного пошкодження клітин мікроорганізмів.

5. Автоматизація процесу. Фармацевтичне виробництво потребує наявності PLC-контролера, сенсорних дисплеїв, можливості програмування параметрів.

6. Стерильність і відповідність GMP. Виробництво пробіотиків вимагає використання сушарок із герметичною камерою, CIP/SIP системами та відповідністю стандартам FDA/GMP.

7. Формат тари. Оскільки пробіотики будуть випускатися у флаконах, необхідна сушарка з рівномірним розподілом температури та можливістю роботи з запаяними флаконами.

Оптимальний вибір сублімаційної сушарки для виробництва пробіотиків у флаконах

Враховуючи всі критерії, було обрано промислову сублімаційну сушарку GEA Lyophil, оскільки вони відповідають таким вимогам: великий об'єм завантаження (до 100 л); температурний контроль  $(-55^{\circ}\text{C}$  до  $+50^{\circ}\text{C}$ );

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 39   |

високий рівень вакууму (до 0,05 мбар); автоматизовані системи керування; відповідність GMP/FDA стандартам; можливість роботи з флаконами у запаяному вигляді. Креслення сушарки наведено у додатку.

Все це забезпечить стабільність, стерильність і якість кінцевого продукту.

Одним із ключових параметрів сублімаційних сушарок є коефіцієнт заповнення ( $\Pi$ ), який визначає ефективність використання форми сублімаційної камери. Чим вище цей коефіцієнт, тим раціональніше використовується об'єм камери при однакових інших умовах.

Для циліндричних сублімаційних камер коефіцієнт заповнення знаходиться в межах  $1/40 - 1/50$ .

Для прямокутних камер цей показник вищий –  $1/20 - 1/30$ .

Враховуючи ці параметри, найбільш оптимальним варіантом для даного процесу є використання сублімаційної установки періодичної дії камерного типу з вбудованим десубліматором та прямокутною формою камери, що забезпечує ефективніше використання об'єму сушильної камери.

При виборі сублімаційної сушарки враховуються наступні основні фактори:

1. Необхідна площа завантаження субліматора ( $F_3$ ). Визначає площу нагрівальних елементів, необхідну для досягнення продуктивності.

2. Кількість видаленої вологи ( $M_v$ ). Визначає навантаження на сублімаційні конденсатори та необхідну потужність вакуумної системи.

3. Теплове навантаження. Включає теплове навантаження в зоні сублімації ( $Q_c$ ) та в зоні досушування ( $Q_d$ ).

4. Час сублімаційної сушки. Визначає тривалість основного технологічного циклу.

За даними матеріального балансу на розлив у флакони перед стадією ліофілізації поступає 14,7 л рідкої біомаси біфідобактерій з початковим вологовмістом  $W_H = 230\%$ , щільністю вологого продукту  $\rho_v = 660 \text{ кг/м}^3$ .

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 40   |

Показники після сушки вологовміст кінцевий  $W_{кін} = 3,5 \%$ , щільність  $\rho_c = 370 \text{ кг/м}^3$ . Температура замерзання (евтектична точка)  $t_z = -12 \text{ }^\circ\text{C}$ . Прийmemo, що температура сублімації:  $t_c = -14 \text{ }^\circ\text{C}$ , температура конденсації:  $t_k = -60 \text{ }^\circ\text{C}$ , загальний тиск у камері:  $0,25 \text{ мм.рт.ст.}$ , коефіцієнт масовіддачі:  $\beta = 0,5 \text{ кг / (мм.рт.ст. х м}^2 \text{ х год)}$ , коефіцієнт швидкості сушки при досушуванні:  $\kappa_1 = 0,51 \text{ х } 10^{-2} \text{ м/(мм рт.ст. х град х год)}$ .

Розрахуємо площу завантаження субліматора.

Процес сушіння в сублімаційній установці розраховується за тією ж методикою, що й у традиційних вакуумних сушарках. Вологий матеріал складається з двох основних компонентів: вологи та сухої речовини.

$$M_m = M_b + M_c,$$

Вологовміст матеріалу розраховується за формулою:

$$W = M_b / M_c$$

Кількість вологи у біомасі перед сушкою:

$$M_{b1} = W_n \cdot m \cdot F_3 / (100 + W_n),$$

де  $W_n$  – початковий вологовміст матеріалу, %;

$m$  – норма завантаження,  $\text{кг/м}^2$ ;

$F_3$  – поверхня завантаження,  $\text{м}^2$ .

Кількість вологи у біомасі після закінчення сублімації:

$$M_{b2} = W_k \cdot m \cdot F_3 / (100 + W_n)$$

де  $W_k$  – вологовміст матеріала після сублімації, %.

Тоді, кількість вологи, що видаляється при сублімації:

$$M_b = M_{b1} - M_{b2} = (W_n - W_k) \cdot m \cdot F_3 / (100 + W_n)$$

$$M_b = (230 - 15) \times 9,7 / (100 + 230) = 6,5 \text{ кг}$$

Тобто, необхідно видалити 6,5 кг вологи, що є корисним навантаженням сублімаційних конденсаторів.

Визначимо час сублімаційної сушки

Швидкість сублімації:

$$S = \beta \times (p_m - p_k)$$

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
|      |      |          |        |      |                     | 41   |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     |      |

де  $\beta$  – емпіричний коефіцієнт масовіддачі;

$p_m$  – тиск насичення при температурі матеріалу, мм.рт.ст., 1,385 мм.рт.ст.

$p_k$  – тиск насичення при температурі конденсації, мм.рт.ст., 0,065 мм.рт.ст.

Тоді:

$$S = 0,5 \times (1,385 - 0,065) = 0,66 \text{ кг} / (\text{м}^2 \cdot \text{год})$$

Продуктивність сублімації:

$$\tau_c = M'_B / S = [(W_H - W_K) \times m \times F_3] / [(100 + W_H) \times \beta \cdot (p_m - p_k) \times F_c],$$

де  $M'_B$  – кількість вологи, що видаляється при сублімації з врахуванням процесу досушування, кг.

$$m = h \times \rho_n,$$

де  $\rho_n$  – щільність сирого матеріалу,

$h$  – товщина матеріалу, що сушиться.

$$h = 2 \times m / \rho_n;$$

$$h = 20 / 660 = 0,03 \text{ м} = 30 \text{ мм.}$$

У сучасних процесах  $F_c = F_3$ , тоді:

$$\tau_c = [(W_H - W_K) \times h \times \rho_n] / [(100 + W_H) \times \beta \times (p_m - p_k)].$$

Щільність початкового матеріалу, що поступає на сушку:

$$\rho_n = [(100 + W_H) \times \rho_c] / 100,$$

$$\tau_c = [(W_H - W_K) \times h \times \rho_c] / [100 \times S].$$

$$\tau_c = [(230 - 15) \times 0,03 \times 370] / [100 \times 0,66] = 36 \text{ год}$$

Час процесу досушування:

$$\tau_d = [2,3 \times \lg \times (W_K / W_{\text{кон}}) \times R_c^{0,75}] / [\kappa_1 \times t_{\text{кон}}^{0,5} \times p_c^{0,2}];$$

$$\tau_d = [2,3 \times \lg (15 / 3,5) \times 0,015^{0,75}] / [0,51 \times 10^{-2} \times 35^{0,5} \times 0,25^{0,2}] = 18 \text{ год}$$

Загальний час сушіння:

$$\tau = \tau_c + \tau_d = 36 + 18 = 54 \text{ год.}$$

Тобто, загальний час сушіння 54 год, але слід враховувати операції завантаження, тоді час 1 циклу сублімації складає 55 год.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
|      |      |          |        |      |                     | 42   |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     |      |

Розрахуємо теплове навантаження.

Кількість тепла на сублімацію матеріалу:

$$Q_c = S \times r_c,$$

де  $r_c$  – прихована теплота сублімації, при  $t_c = -14^\circ\text{C}$   $r_c = 1000$  кКал/кг;

$$Q_c = 0,66 \cdot 1000 = 660 \text{ кКал} / (\text{м}^2 \cdot \text{год}).$$

Кількість тепла на досушування матеріалу:

$$Q_d = \rho_c \times R_c \times [(W_k - W_{\text{кон}}) \times r_c + (100 + W_k) \times c \times (t_{\text{кон}} - t_c)] / 100 \times \tau_d,$$

де  $c$  – середня теплоємність матеріалу при досушуванні.

$$Q_d = 370 \times 0,015 \times [(15 - 3,5) \times 1000 + (100 + 15) \times 0,5 \times (35 - (-14))] / 100 \\ \times 18 = 44 \text{ кКал} / (\text{м}^2 \times \text{год})$$

Розрахуємо нагрівачі:

$$Q_n = 1,5 \times 660 = 990 \text{ кКал} / (\text{м}^2 \times \text{год}),$$

де 1,5 – коефіцієнт нерівномірності сублімації.

Тоді повна потужність для нагрівачів:

$$Q_{\text{нп}} = F \times Q_n = 1 \times 990 = 990 \text{ кКал} / (\text{м}^2 \times \text{год}).$$

Розраховані параметри задовольняють обраній сублімаційній сушарці.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
|      |      |          |        |      |                     | 43   |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     |      |

### 3.3 Опис технологічного процесу

#### Стадія 1. Приготування робочого розчину

20%-й розчин натрію гідроксиду готують, розчиняючи 200 г речовини у 500 мл очищеної води. Після нагрівання та перемішування об'єм доводять до 1 л. Готовий розчин маркують і використовують у кількості 0,19 л на одну серію.

#### Стадія 2. Приготування середовища Блаурока

Печінку ВРХ очищають, подрібнюють та екстрагують у воді (1 л на 1 кг) протягом 20 год при  $6 \pm 2$  С. Після кип'ятіння та фільтрації отриманий екстракт 2 л змішують із 20 г пептоном, 1,86 г агаром, 10 г натрію хлоридом. Суміш кип'ятять 15 хв, фільтрують, додають 20 г лактози та 200 мг цистеїну, перемішують. Середовище коригують за рН 7,0 20 % розчином натрію гідроксиду. Отримане середовище розливають у необхідний на подальших стадіях посуд (у пробірки в кількості по 9,5 мл та 25,5, колби – по 300 мл та 500 мл). Стерилізують в автоклаві при  $120 \pm 1$  С, 0,11 МПа, 30 хв.

#### Стадія 3. Приготування казеїново-дріжджового середовища

Приготування гідролізату казеїну. Для приготування гідролізату казеїну використовують ємності об'ємом 15 л. У кожну з них поміщають по 0,6 кг казеїну та додають 10 л очищеної води. Суміш перемішують та витримують у термостаті при  $60 \pm 2$  °С протягом 5 год. Після проводять коригування рН суміші до  $8,2 \pm 0,1$ , додаючи 20% розчин натрію гідроксиду. Після стабілізації показника рН у кожну ємність додають по 170 мл хлороформу, повторно перевіряють рН та коригують його до  $8,2 \pm 0,1$ . Далі ємності знову поміщають у термостат при температурі  $60 \pm 2$  °С. Через 12 годин перевіряють рівень рН, який повинен бути  $7,9 \pm 0,1$ . Подальші перевірки проводять кожні 8 год. Через 3-4 доби визначають вміст амінного азоту. Завершення процесу гідролізу фіксують при припиненні зростання рівня амінного азоту, а також при

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
|      |      |          |        |      |                     | 44   |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     |      |

візуальному прозорому стані суміші. Готовий гідролізат повинен мати вміст амінного азоту  $500 \pm 100$  мг% та рН  $7,8 \pm 0,2$ . Після завершення гідролізу проводять декантацію гідролізату з подальшою фільтрацією через спеціальний фільтр у чисті ємності об'ємом 15 л. Далі гідролізат стерилізують у автоклаві при  $120 \pm 1$  °С, 0,11 МПа, 30 хв. Контрольна проба після стерилізації повинна відповідати параметрам: аміний азот  $500 \pm 100$  мг% та рН  $7,9 \pm 0,1$ . Для приготування однієї серії препарату потрібно 1,0 л гідролізату казеїну.

Приготування дріжджового автолізату. У ємність поміщають 1,0 кг дріжджів і витримують у термостаті при  $58 \pm 2$  °С 48 год. Після додають 9 л питної води, а отриманий розчин стерилізують в автоклаві при  $120 \pm 1$  °С, 0,11 МПа, 30 хв. Після стерилізації автолізат витримують при кімнатній температурі 5-7 днів, після чого проводять контроль вмісту амінного азоту, який повинен становити  $500 \pm 100$  мг%. Для однієї серії необхідно 6,13 л дріжджового автолізату.

Приготування казеїново-дріжджового середовища. Отриманий гідролізат казеїну фільтрують через фільтр та додають очищену воду, доводячи вміст амінного азоту до  $150 \pm 10$  мг%. У реактор додають: 42,9 л профільтрованого дріжджового автолізату, 23,13 л гідролізату казеїну. Суміш ретельно перемішують, після чого додають 0,33 кг натрію хлориду. Розчин перемішують, встановлюють рН до  $7,7 \pm 0,2$  та кип'ятять 20 хв. Отримане середовище фільтрують, додають очищену воду до загального об'єму 66 л. Далі у фільтрат додають: 0,66 кг лактози, 0,033 кг мікробіологічного агару, 0,066 г цистеїну. Готове середовище фільтрують у ємності об'ємом 9,5 л, після чого стерилізують в автоклаві при  $120 \pm 1$  °С, 0,11 МПа, 30 хв. Контрольна проба готового казеїново-дріжджового середовища повинна відповідати наступним параметрам: вміст амінного азоту 130-180 мг%, рН ( $7,2 \pm 0,2$ ). Для виробництва 1 серії необхідно 9,5 л середовища.

Стадія 4. Приготування захисного (сахарозо-желатинового) середовища

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 45   |

Зважують 2,25 кг желатини, додають 6,9 л очищеної води, витримують 10-20 хв для набухання, після чого стерилізують у автоклаві при  $120 \pm 1$  °С, 0,11 МПа, 45 хв.

У варильний котел на 50 л подають 10 л очищеної води та підігрівують до температури  $50 \pm 1$  °С, додають 15 кг сахарози, перемішують до повного розчинення, додають підготовлений розчин желатини. Отриману суміш фільтрують по 1,4 л у ємності об'ємом 3 л. Далі середовище стерилізують у автоклаві при  $111 \pm 1$  °С, 0,08 МПа, 30 хв. На 1 серію потрібно 1,4 л.

#### Стадія 5. Вирощування генерацій культури *B. bifidum* BGN4

Для отримання достатньої кількості біомаси активних клітин біфідобактерій проводять послідовне культивування 5 генерацій. Вирощування всіх генерацій відбувається при температурі  $38 \pm 1$  °С, 1-4 генерацій - протягом 24 год, 5 генерації – 48 год. Для перевірки чистоти культури на кожному етапі здійснюють висів у пробірки з агаром із глюкозою, МПА та агаром Сабуро.

Ліофілізат штаму *B. bifidum* BGN4 у флаконі в умовах асептичного боксу розводять у середовищі Блаурока у 2 пробірках (по 9,5 мл) та вирощують у термостаті. Після культивування 1 генерацію культури з пробірок пересівають у колби з 25 мл середовища Блаурока. Вирощують у термостаті, потім 2 генерацію пересівають у більші колби з 300 мл середовища Блаурока, та знову вирощують за цих же умов. 100 мл 3 генерації біфідобактерій пересівають у колби об'ємом 500 мл з середовищем Блаурока. Умови вирощування ті ж самі. Вирощену 4 генерацію у кількості 2,1 л перекачують у ємності із 9,5 л казеїново-дріжджового середовища. Ємності поміщають у термостатну кімнату, після вирощування отримують 5 генерацію культури, яку після відбору проб на контроль направляють на розлив у флакони.

Після завершення всіх етапів вирощування здійснюють контроль мікроскопічних та морфологічних властивостей та відсутність сторонньої мікрофлори.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 46   |

#### Стадія 6. Змішування біомаси із захисним середовищем

У кожен ємність з 5 генерацією додають 1,4 л сахарозо-желатинового середовища та 2,1 л стерильного знежиреного молока. Бутлі закупорюють пробками та передають на стадію розливу. Загальний об'єм серії становить 14,7 л біомаси.

#### Стадія 7. Підготовка флаконів і закупорювальних засобів

Флакони мийуть, стерилізують і перевіряють на стерильність. Гумові пробки та алюмінієві ковпачки очищають, стерилізують і передають для закупорювання.

#### Стадія 8. Розлив рідкої біомаси культури *B. bifidum* BGN4

Рідку біомасу під тиском подають на лінію наповнення, поступово після наповнення флакони передаються у лоток, в якому збираються в касети. На стадії контролюють точність дозування.

#### Стадія 9. Сублімаційна сушка

Флакони з рідкою біомасою поміщають у сублімаційну сушарку, де відбувається процес заморожування та висушування до залишкової вологості 3–5%.

#### Стадія 10. Укупорювання флаконів з препаратом

Процес відбувається на автоматичній лінії із послідовним закупорюванням пробками та завальцьовуються алюмінієвими ковпачкам. і та перевіряють герметичність і стерильність. На стадії контролюють герметичність та відсутність сторонньої мікрофлори.

#### Стадія 11. Пакування та маркування

Флакони маркують, пакують у картонні коробки разом із листком-вкладишем та відправляють до карантинного складу, з якого продукт після отримання позитивних результатів контролю відправляється на склад готової продукції.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
|      |      |          |        |      |                     | 47   |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     |      |

### 3.4 Схеми виробництва

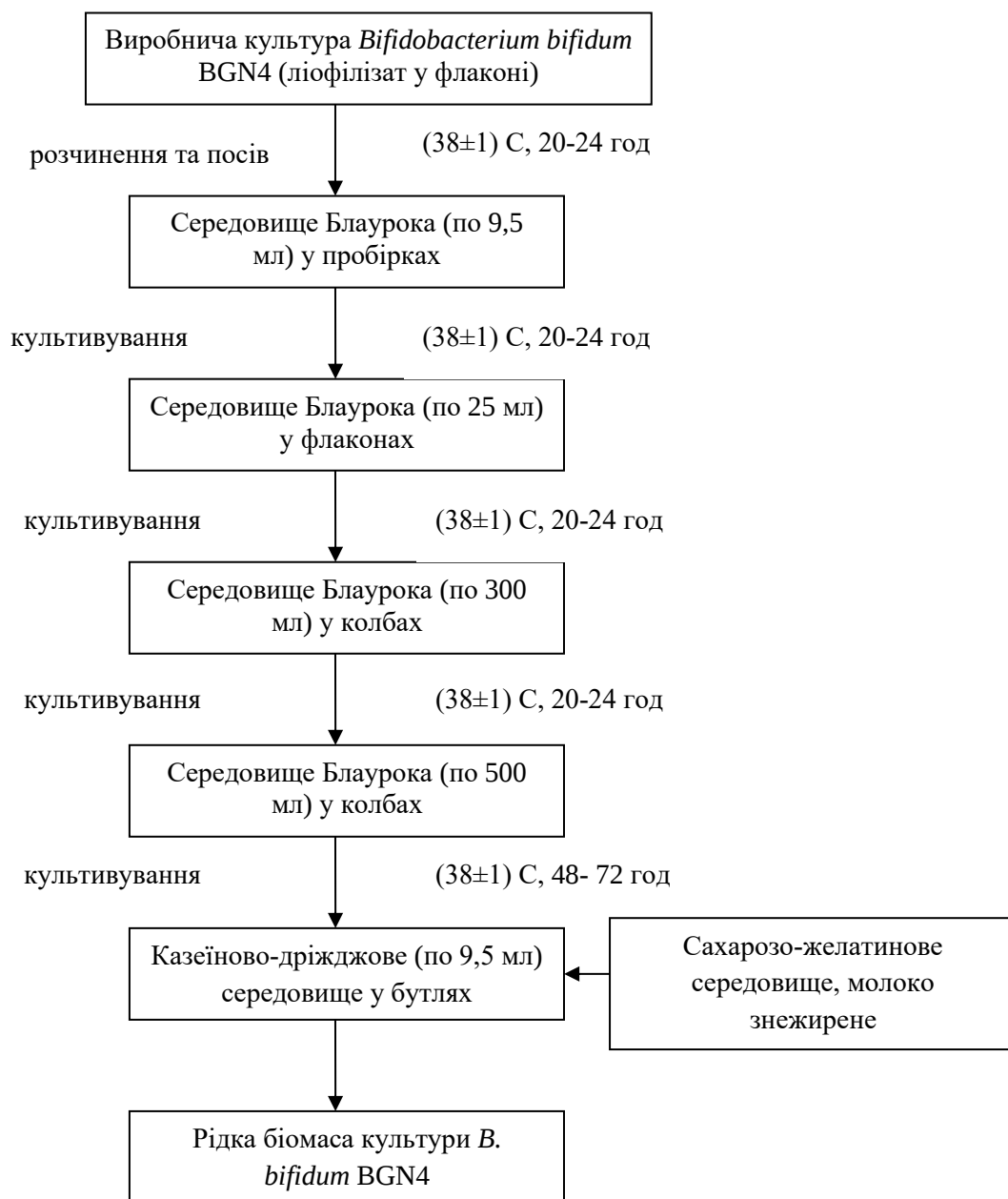


Рис. 3.1 – Біологічна схема виробництва рекомбінантного пробіотика у вигляді ліофілізата у флаконах

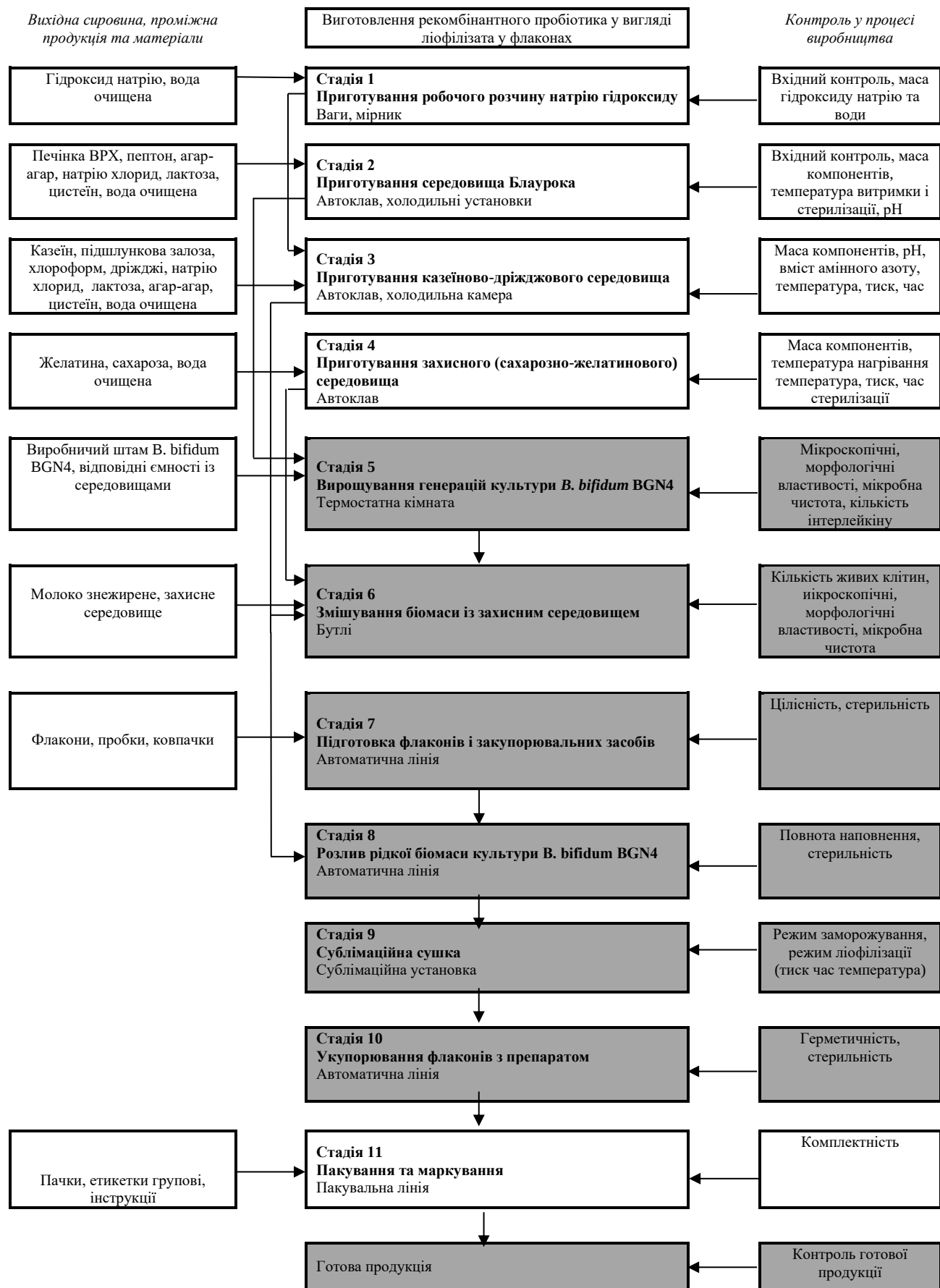


Рис. 3.2 – Технологічна схема





### 3.5 Контроль виробництва

Контроль параметрів кожної стадії виробництва відбувається по ходу процесу за допомогою контрольно-вимірювальних пристроїв (тиск, температура, час, об'ємно-вагові показники), параметри кожного наведені по ходу технологічного процесу.

Готовий продукт повинен відповідати вимогам специфікації:

1. Опис мікроорганізму визначається згідно з ДФУ 2.5, загальна монографія на ЖБЛЗ як визначення якісного складу. Для препарату – наявність у препаратах забарвлених за Грамом грампозитивних паличок з біфуркацією на кінцях

2. Число живих мікроорганізмів (кількісний склад препарату) згідно з ДФУ 2.5, загальна монографія на ЖБЛЗ. Метод поверхневого висівання. Для даного препарату –  $1 \times 10^7$  КУО/мл в 1 дозі.

3. Мікробіологічні випробування живих біотерапевтичних лікарських засобів: визначення числа забруднювальних мікроорганізмів ДФУ 2,5, стаття 2.6.36. Критерій прийнятності ЖБЛЗ для неводних препаратів для орального застосування – число забруднювальних аеробних мікроорганізмів АМСС не більше  $10^3$ , число забруднювальних дріжджових та плісневих грибів УМСС не більше  $10^2$

4. Мікробіологічні випробування живих біотерапевтичних лікарських засобів: випробування на окремі види мікроорганізмів ДФУ 2,5, стаття 2.6.38. Критерій прийнятності для неводних препаратів для орального застосування – відсутність *Escherichia coli* в 1 г або в 1 мл.

5. рН визначається згідно з ДФУ , стаття 2.2.3. Для препарату повинна бути в межах 5,3-6,7.

6. Втрата в масі при висушування визначається згідно з ДФУ, стаття 2.2.32. Визначається по залишковій вологості не більше 3,5 %.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 52   |

Додатково до вимог ДФУ визначають специфічну нешкідливість та специфічну активність препарату (антагоністичну активність та синтез інтерлейкіну).

7. Специфічна активність визначається в дослідах на мишах. Препарат не повинен спричиняти жодних негативних реакцій у білих мишей при пероральному введенні в кількості, що відповідає одній дозі.

8. Антагоністична активність визначається за потенційною можливістю біфідобактерій виробляти антимікробні метаболіти, зокрема молочної кислоти. Стерильною піпеткою відбирають 0,1 мл суспензії у фізіологічному розчині (розраховуючи 5 мл фізіологічного розчину на 1 дозу препарату). Отриману суспензію наносять краплею на чашку Петрі, що містить агар із додаванням карбонату кальцію (у співвідношенні 0,5 г карбонату кальцію на 10 мл середовища). Чашки витримують у термостаті при 38 °С 24 год. Після завершення культивування аналізують кількість зон просвітлення на поверхні агара, що є показником інтенсивності утворення молочної кислоти біфідобактеріями.

9. Для оцінки кількості людського інтерлейкіну-10 (hIL-10) у супернатанті культуральної рідини рекомбінантних бактерій використовують сендвіч-ферментний імуносорбентний аналіз (ELISA). Вирощені клітини бактерій у середовищі MRSC при 37°C 18 год в анаеробних умовах у 120 мл культурального бульйону збирали шляхом центрифугування. Далі отримані осадки інокулювали у 1,2 л свіжого бульйону MRS (рН 6,5) у співвідношенні 10% (v/v) та культивували при 37°C. Бактеріальний супернатант відбирали та аналізують. Для даного препарату активність на рівні  $1473 \pm 300$  нг /мл hIL-10.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
|      |      |          |        |      |                     |      |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 53   |

### 3.6 Екологічні аспекти виробництва

Однією з основних проблем, пов'язаних із використанням рекомбінантних пробіотичних штамів, є забезпечення їхньої безпеки. Особливу увагу слід приділяти оцінці вірулентних властивостей та потенційної патогенності бактерій.

Хоча пробіотики загально визнані як корисні для здоров'я, їх застосування може викликати певні побічні ефекти, зокрема: гіперактивацію імунної системи, мутагенез та небажану метаболічну активність, кишкові дисфункції, стимуляцію імунної відповіді у пацієнтів із підвищеною чутливістю.

Окремою проблемою є антибіотикорезистентність пробіотичних штамів. Хоча природна стійкість до антибіотиків сприяє підтримці мікробного балансу кишечника, існує ризик горизонтального переносу генів резистентності до патогенних бактерій, що може призвести до появи мультирезистентних штамів. Тому виключення генів стійкості до антибіотиків є критично важливим кроком для підвищення безпеки рекомбінантних пробіотиків.

Таким чином, застосування пробіотиків вимагає суворого регулювання через наявність у них додаткових генів, що можуть впливати на імуномодуляцію, антигенність та метаболічні процеси організму. Також існують побоювання щодо можливості поширення рекомбінантних пробіотиків у навколишньому середовищі та їхнього впливу на екосистеми.

Отже, виробництво рекомбінантного пробіотика потребує ретельного дотримання екологічних стандартів, оскільки воно передбачає використання генетично модифікованих організмів, біотехнологічних процесів та специфічних середовищ для культивування мікроорганізмів. Основні екологічні аспекти, які повинен врахувати виробник, включають:

1. Контроль за ГМО та запобігання неконтрольованому викиду, що може досягатися наступними заходами:

- Виробник повинен впровадити біологічну ізоляцію для запобігання виходу рекомбінантних мікроорганізмів за межі виробничих приміщень.
- Застосування фільтраційних систем HEPA у вентиляційних установках для уловлювання мікробних частинок.
- Всі маніпуляції з рекомбінантними бактеріями повинні відбуватися в спеціально обладнаних біобезпечкових лабораторіях (Biosafety Level 1-2).
- Використання маркованих штамів з ослабленими або залежними від певних умов формами життєдіяльності (наприклад, штами, що не виживають поза лабораторним середовищем).

2. Очищення стічних вод та відходів, що може бути реалізована наступними заходами:

- Обов'язкова стерилізація стоків перед скиданням у каналізаційну систему, оскільки у відходах можуть міститися залишки ГМО.
- Використання автоклавів та біореакторів для термічної дезінфекції біологічних відходів.
- Впровадження очисних споруд з біофільтрами та активованим вугіллям для нейтралізації залишкових продуктів ферментації.

3. Поводження з відходами виробництва, а саме:

- Поділ відходів на біологічні, хімічні та тверді промислові з їх подальшою утилізацією відповідно до норм.
- Біологічні відходи (відпрацьовані пробіотичні культури, середовища) підлягають обов'язковій стерилізації перед утилізацією.
- Хімічні реагенти (буферні розчини, антибіотики, допоміжні речовини) необхідно нейтралізувати або утилізувати через спеціалізовані підприємства.

4. Контроль викидів у повітря повинно реалізовуватись через:

- Використання систем фільтрації газових викидів, щоб уникнути потрапляння аерозолів з рекомбінантними мікроорганізмами в атмосферу.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 55   |

- Регулярний моніторинг складу повітря у виробничих приміщеннях та зоні скиду викидів.

- Обладнання установок каталітичного окиснення для нейтралізації летких органічних сполук, які можуть утворюватися під час ферментації.

5. Використання ресурсів (енергія, вода, сировина), які можна впровадити на підприємстві через такі заходи:

- Оптимізація споживання електроенергії через використання енергоефективного обладнання та відновлюваних джерел енергії (сонячні панелі, рекуперація тепла).

- Рациональне використання очищеної води та її повторне використання для технологічних процесів, коли це можливо.

- Впровадження замкнених циклів водопостачання для мінімізації скидів.

- Оптимізація складу поживних середовищ для зменшення використання хімічних компонентів.

6. Дотримання міжнародних екологічних стандартів та нормативних актів, зокрема виробництво має відповідати біотехнологічним та екологічним стандартам: GMP (Good Manufacturing Practice) – належна виробнича практика, GLP (Good Laboratory Practice) – належна лабораторна практика, ISO 14001 – система екологічного менеджменту, Картахенський протокол – регулює поводження з ГМО, Нормативні акти щодо ГМО в ЄС (Directive 2001/18/EC), США (FDA, EPA), Україні (Закон України "Про державну систему біобезпеки").

7. Моніторинг екологічних ризиків, а саме підприємство повинно проводити:

- Регулярне тестування проб води, повітря та ґрунту навколо виробництва.

- Контроль за можливим накопиченням антибіотикорезистентних генів у навколишньому середовищі.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 56   |

- Проведення екологічних аудитів та оцінки впливу на навколишнє середовище (ОВНС).

Таким чином, виробництво рекомбінантного пробіотика повинно відповідати суворим екологічним вимогам, щоб запобігти потенційним ризикам, пов'язаним з неконтрольованим розповсюдженням ГМО, забрудненням води, повітря та утворенням небезпечних відходів. Впровадження сучасних технологій стерилізації, фільтрації, замкнених циклів водопостачання та дотримання міжнародних стандартів забезпечить безпечне виробництво та мінімальний вплив на навколишнє середовище.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
|      |      |          |        |      |                     | 57   |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     |      |

## ВИСНОВОК

Рекомбінантні пробіотики є перспективним напрямом у розробці біопрепаратів, оскільки вони мають можливість не лише зберігати корисні властивості природних штамів, а й продукувати біологічно активні речовини, зокрема імуномодуючі білки, антимікробні пептиди тощо. Вони можуть бути використані у терапії різних захворювань, включаючи аутоімунні патології, хронічні запальні процеси та дисбіози.

У роботі як основу для організації виробництва рекомбінантного пробіотика ми обрали штами родини *Bifidobacterium* spp., які є типовими пробіотиками та відіграють важливу роль у здоров'ї своїх господарів. Серед різноманітних *Bifidobacterium* spp., *B. bifidum* BGN4 демонструє відносно високу адгезію клітин до клітин товстої кишки та має різні біофункціональні властивості *in vivo* та *in vitro* (наприклад, протиалергічну дію, протиракову дію та модулюючий вплив на імунні клітини). Інтерлейкін-10 (IL-10) став основним супресором імунної відповіді в макрофагах та інших антигенпрезентуючих клітинах і відіграє важливу роль у регуляції та зникненні запалення. У цій роботі рекомбінантний *B. bifidum* BGN4 [pBESIL10] був через його ефективність для доставки людського IL-10 у кишечник.

У роботі складено опис технологічного процесу виробництва пробіотика у вигляді ліофілізованого порошку у флаконах, що базувався на стандартних для пробіотиків схемах та середовищах, було складено біологічну, технологічну та апаратурну схему, розрахований матеріальний баланс та основне обладнання стадії сублімації. Результати роботи можуть бути використані фармацевтичними підприємствами та біотехнологічними компаніями при розробці та впровадженні у виробництво пробіотичних препаратів нового покоління.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 58   |

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Державна Фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-ге вид. Допов. 6. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2023. 422 с.
2. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Допов. 5. Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2021. 424 с.
3. Дудна Д., Стернберг С. Зламати ДНК. Редагування генома та контроль над еволюцією / пер. Г. Литвиненко. Київ : Наш формат, 2019. 296 с.
4. Калюжная О. С. Новітні технології виробництва біопрепаратів. Технології виробництва біологічних лікарських засобів : навч. посіб. для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти спец. «Біотехнології та біоінженерія», «Фармація, промислова фармація» та ін. споріднених спец. / О. С. Калюжная, Н. В. Хохленкова, Н. В. Кишинець. Харків : Вид-во НФаУ, 2023. 152 с.
5. Краснопольський Ю. М., Пилипенко Д. М. Фармацевтична біотехнологія: сьогодення та майбутнє : навч. посіб. для студентів біотехнологічних спец. Харків : Друкарня Мадрид, 2022. 151 с.
6. Красінько В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв : конспект лекцій. Київ : НУХТ, 2019. 252 с.
7. Методичні рекомендації до виконання кваліфікаційної роботи бакалавра для здобувачів вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» ОП «Біотехнологія» / О. С. Калюжная та ін. Харків : НФаУ, 2024. 128 с.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 59   |

8. Півень О. О., Скоробогатова З. М. Сучасні інструменти редагування геному з основами молекулярної генетики : навч. посіб. Київ : Біокомполіт, 2021. 178 с.

9. Пономарьов П. Х., Притульська Н. В., Донцова І. В. Генетично модифіковані організми: трансгенні культури, ферментні препарати, харчові продукти : монографія. Київ : Київ. нац. торг.-екон. ун-т, 2014. 208 с.

10. Соловйова А. В. Розробка складу та технології комплексного засобу з пробіотиком для лікування дерматологічних захворювань : дис. на здобуття наук. ступ. д-ра філософії за спец. 226 – «Охорона здоров'я» / А. В. Соловйова ; Національний фармацевтичний університет. Харків, 2022. 207 с

11. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. І. Ферментація. Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2004. 240 с.

12. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. II. Обробка культуральних рідин. Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2004. 296 с.

13. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. III. Основи проектування мікробіологічних виробництв. Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2004. 252 с.

14. Технологічне обладнання біотехнологічної і фармацевтичної промисловості : підруч. для вищ. навч. закл. / М. В. Стасевич та ін. Львів : Новий Світ-2000, 2018. 410 с.

15. Технологія пробіотиків : підручник / С. О. Старовойтова та ін. Київ : НУХТ, 2012. 318 с.

16. Про лікарські засоби : Закон України від 04.04.96р. № 124/96-ВР. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2469-20#Text> (дата звернення: 01.12.2024).

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 60   |

17. Шапран Ю. П. Біотехнологія, генна інженерія : навч.-метод. посіб. Переяслав-Хмельницький : Домбровська Я., 2019. 132 с.

18. A review article on the role of normal microbial flora in human body Suneeta / Singh et al. *Conference: Recent Trends in Medical Diagnostic Technology*. 2023. URL: [https://www.researchgate.net/publication/375496263\\_A\\_review\\_article\\_on\\_the\\_role\\_of\\_normal\\_microbial\\_flora\\_in\\_human\\_body](https://www.researchgate.net/publication/375496263_A_review_article_on_the_role_of_normal_microbial_flora_in_human_body) (Date of access: 01.11.2024).

19. Arora M. Regulatory categories of probiotics across the globe: A review representing existing and recommended categorization / M. Arora et al. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2015. Vol. 33(5). P. 2-10. DOI: 10.4103/0255-0857.150868.

20. A systematic framework for understanding the microbiome in human health and disease: from basic principles to clinical translation / Z. Ma et al. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2024. Vol. 9(1). P. 237. DOI: 10.1038/s41392-024-01946-6.

21. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family / P. Alvarez-Sieiro et al. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016. Vol. 100. P. 2939–2951. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-016-7343-9#Tab1> (Date of access: 01.11.2024).

22. Characteristics of Probiotic Preparations and Their Applications / G. Wang et al. *Foods*. 2022. Vol. 11(16). P. 2472. DOI: 10.3390/foods11162472.

23. Engineered probiotics / J. Ma et al. *Microb Cell Fact*. 2022. Vol. 21(1). P. 72. DOI: 10.1186/s12934-022-01799-0.

24. Environmental Chemicals, the Human Microbiome, and Health Risk: A Research Strategy / National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Washington (DC): National Academies Press (US). 2017. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK481560/> (Date of access: 01.11.2024).

25. European Medicines Agency. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/homepage>. (Date of access: 01.12.2024).

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 61   |

26. Food and Agriculture Organization of the United Nations. URL: <https://www.fao.org/home/en>. (Date of access: 01.12.2024).

27. Guidance for Industry on Complementary and Alternative Medicine Products and Their Regulation by the Food and Drug Administration. URL: <https://www.fda.gov/files/about%20fda/published/Guidance-for-Industry---Complementary-and-Alternative-Medicine-Products-and-their-Regulation-by-the-Food-and-Drug-Administration-%28PDF%29.pdf>. (Date of access: 01.11.2024).

28. Hye J. J., Na-Kyoung A. L., Hyun-Dong P. A Narrative Review on the Advance of Probiotics to Metabiotics. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2024. Vol. 34(3). P. 487-494. DOI: 10.4014/jmb.2311.11023.

29. Probiotics : Food and Agriculture Organization of the United Nations. URL: <https://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/probiotics/en/> (Date of access: 01.11.2024).

30. Probiotics and prebiotics / World Gastroenterology Organisation Global Guidelines World. Gastroenterology Organisation. Francisco Guarner, 2023. 52 p. URL: <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-english-2023.pdf>. (Date of access: 01.12.2024).

31. Production of biologically active human interleukin-10 by Bifidobacterium bifidum BGN4 / N. Hong et al. *Microbial Cell Factories*. 2021. Vol. 16. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01505-y>.

32. Review on Bifidobacterium bifidum BGN4: Functionality and Nutraceutical Applications as a Probiotic Microorganism / S. Ku et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. Vol. 17 (19). DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17091544>.

33. Singh B., Mal G., Marotta F. Designer Probiotics: Paving the Way to Living Therapeutics. *Science & society*. 2017. Vol. 35(8). P. 679-682. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.04.001.

34. The Production and Function of Endogenous Interleukin-10 in Intestinal Epithelial Cells and Gut Homeostasis / Huong D. Nguyen et al. *Cellular and*

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     | 62   |

*Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2021. Vol. 4. P. 1343-1352. URL:  
<https://www.cmghjournal.org/article/S2352-345X%2821%2900150-8/fulltext>  
(Date of access: 01.12.2024).

35. The Prospects for the Therapeutic Implications of Genetically Engineered Probiotics / S. F. Mazhar et al. *Journal of Food Quality*. 2020. Vol. 2020(1). P. 1-11. DOI: 10.1155/2020/9676452.

|      |      |          |        |      |                     |      |
|------|------|----------|--------|------|---------------------|------|
|      |      |          |        |      | 162.01.14.00 000 ПЗ | Арк. |
|      |      |          |        |      |                     | 63   |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата |                     |      |

## **ДОДАТКИ**

## СУЧАСНІ ТЕНДЕНЦІЇ СТВОРЕННЯ ТА ВИКОРИСТАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ПРОБІОТИКІВ

*Торкасино К.В., Хохленкова Н.В., Калюжная О.С.*

**Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна**

**Вступ.** Дослідження пробіотиків мають довгу історію, яка налічує сотні років. Спочатку вчені зосередилися на використанні пробіотиків для запобігання та лікування шлунково-кишкових інфекцій. Поступово дослідження пробіотиків розширилися завдяки доведенню інших переваг для здоров'я, таких як вплив на модуляцію імунної системи та виробництво біоактивних сполук. Це призвело до розробки пробіотичних продуктів для широкого спектру застосувань, включаючи здоров'я ротової порожнини, шкіри, лікування алергій, метаболічних розладів, запальних захворювань кишечника. У XX ст. із впровадженням новітніх технологій, зокрема генетичного секвенування та біоінформатики, сфера досліджень пробіотиків продовжувала розвиватися. У результаті вчені змогли виявити нові пробіотичні штами та створити рекомбінантні штами з новими властивостями.

**Мета дослідження.** Проаналізувати поточні розробки у галузі створення рекомбінантних пробіотиків як нових терапевтичних засобів для покращення здоров'я людини.

**Методи дослідження.** Аналіз статей у базах даних Scopus, PUBMED і Google Scholar та нормативної документації галузі.

**Основні результати.** Слово «пробіотики» уперше з'явилося у 1974 р., а у 2001 р. Продовольча і сільськогосподарська організація Об'єднаних Націй (FAO) і Всесвітня організація охорони здоров'я (WHO) визначили пробіотики як «живі мікроорганізми, які при введенні в адекватних кількостях сприяють здоров'ю господаря». Згідно із загальною монографією ДФУ 2.5 пробіотики, тобто «живі біотерапевтичні лікарські засоби (ЖБЛЗ, Live Bioterapeutical Products, LBP) – це призначені для застосування людиною лікарські засоби, що містять живі мікроорганізми (бактерії або дріжджі)».

Доступність секвенування генома, розвиток інструментів та технологій для редагування та модифікації мікробного генома дозволили вдосконалити пробіотичні препарати в напрямку створення рекомбінантних або генно-модифікованих пробіотичних препаратів (ГМ-пробіотики). При виробництві ГМ-пробіотиків застосовують методи генної інженерії: від гомологічної рекомбінації до технологій редагування геномів - ZFN, TALEN і CRISPR-Cas. Згідно із загальною монографією ДФУ 2.6 такі препарати відносяться до «лікарських засобів, одержуваних за допомогою технологій рекомбінантної ДНК» (рДНК) (Products of recombinant DNA (rDNA) technology). За монографією ці ЛЗ «виробляють, використовуючи генетичні модифікації, за яких ДНК, що кодує цільовий лікарський засіб, зазвичай вводять за допомогою плазмиди або вірусного вектора в придатні мікроорганізми, такі як бактерії та дріжджі, або придатну культуру клітин ссавців (включно з людиною), комах або рослин. Надалі введена ДНК експресується як білок. Далі цільовий лікарський засіб екстрагують й очищають».

Сучасні досягнення генної інженерії дозволили створювати ГМ-пробіотики із різним функціональним направленням: для виробництва антимікробних пептидів (АМП); із підвищеною стресостійкістю; із протираковою активністю; із впливом на когнітивні функції; із активністю проти ВІЛ; із властивостями імунomodуляції та цитозахисту; із властивостями регуляції експресії вірулентного гена.

Резистентність бактеріальних патогенів до антибіотиків вимагає використання альтернативних стратегій боротьби із інфекціями, зокрема використання АМП, які виробляються і деякими пробіотичними штамами. Успішним прикладом є штам *Lactococcus lactis* IL1403, створений для експресії та секреції АМП зі значною активністю проти грамнегативних бактеріальних патогенів, а саме штамів *Salmonella* та *E. coli*.

Стійкість до температури, рН, концентрації солей є привабливою технологічною властивістю пробіотичних штамів. Прикладом досягнень цього напрямку є конструювання термостійкого штаму *Lactobacillus paracasei* NFBC338 з можливістю експресії білків теплового шоку («GroES» і «GroEL»). Іншим прикладом є створення штаму *Lactobacillus salivarius* UCC118 із підвищеною солестійкістю завдяки системі експресії BetL (Listerial betaine transport uptake system), який попередньо був виявлений у бактерії виду *Listeria*.

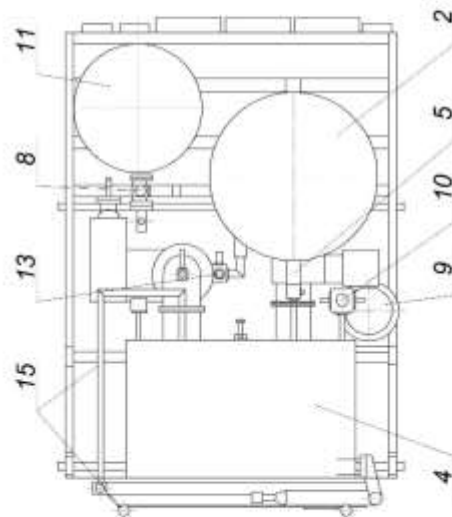
Багато видів бактерій, таких як клостридії, при введенні в пухлинні клітини призводили до посилення реплікації бактерій у пухлині і були визнані корисними для боротьби з раком. За цією стратегією був сконструйований штам *Salmonella typhimurium* A1-R (варіант GM tumor-targeting), та непатогенні пробіотичні штами, наприклад *Escherichia coli* Nissle 1917.

Останні роки ведуться розробки із, так званими, психобіотиками - групою пробіотиків, які здатні виробляти нейроактивні молекули (серотонін і гамма-аміномасляну кислоту). Кишкові мікроорганізми та їх метаболіти можуть впливати на розвиток ЦНС і регулювати реакції на стрес. Перспективним у цьому напрямі є створений штам *Lactobacillus rhamnosus* JB-1.

Існують дослідження щодо ефективності противірусних пептидів пробіотиків у захисті від ВІЛ-інфекції. Так, пептид HIV-gp41, сконструйований з використанням штаму *E. coli* Nissle 1917 (EcN), допомагає пригнічувати ВІЛ-інфекцію.

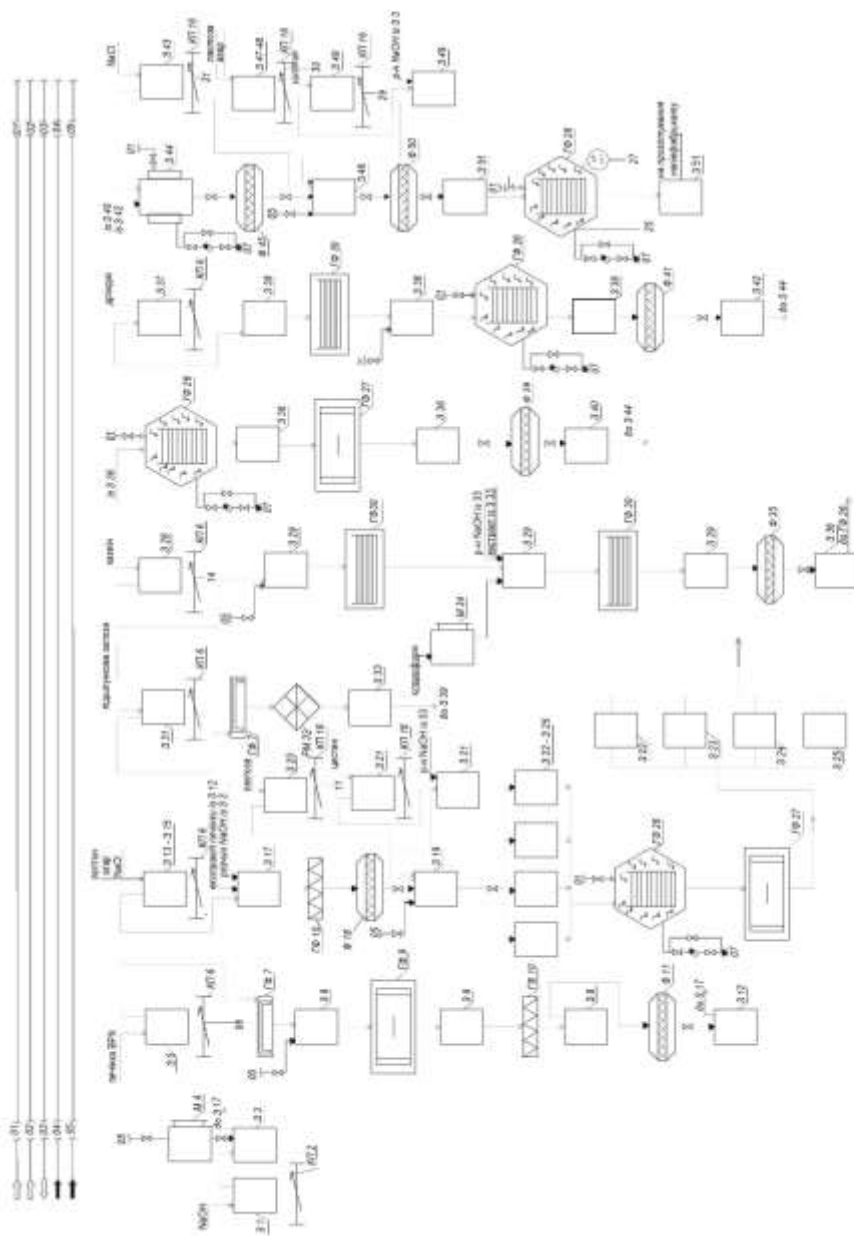
Прикладами ГМ-пробіотиків, здатних стимулювати потужну імунну відповідь, є сконструйовані штами *Lactobacillus paracasei* ATCC 393 pLZ15 та *Lactococcus lactis* NZ9000. Також, перспективною є розробка штаму *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826, що секретує людський інтерферон- $\beta$  (huIFN- $\beta$ ), який, у свою чергу, викликає підвищену секрецію експресії IL-10 та таким чином значно зменшує мікробний коліт і запальний процес.

**Висновки.** Таким чином, сучасні досягнення біотехнології, зокрема технологій рекомбінантної ДНК, дозволили створювати ГМ-пробіотики із різним функціональним направленням, що забезпечує великий потенціал для лікування та діагностики різних типів захворювань людини, а сконструйовані пробіотики стають ефективними засобами для лікування раку, запалень, інфекцій тощо.



| Перелік складових частин обладнання |                     | Найменування |            | Кількість |
|-------------------------------------|---------------------|--------------|------------|-----------|
| №                                   | Позначення          | Кількість    | Позначення | Кількість |
| 1                                   | Двиг                | 1            |            |           |
| 2                                   | Конденсатор         | 1            |            |           |
| 3                                   | Насос евакуаційний  | 1            |            |           |
| 4                                   | Камера сушіння      | 1            |            |           |
| 5                                   | Кабель магнітний    | 1            |            |           |
| 6                                   | Купольний           | 1            |            |           |
| 7                                   | Насос циркуляційний | 2            |            |           |
| 8                                   | Електропостачання   | 1            |            |           |
| 9                                   | Насос суцільний     | 1            |            |           |
| 10                                  | Фільтр поточний     | 2            |            |           |
| 11                                  | Термометр           | 1            |            |           |
| 12                                  | Суміш теплоносія    | 1            |            |           |
| 13                                  | Вихлоп диф.         | 2            |            |           |
| 14                                  | Модуль насоса       | 1            |            |           |
| 15                                  | Кабель від насоса   | 1            |            |           |

[illegible]



162.01.14.00 000 AQ

Государственный университет

| Условие размещения<br>защита | доля          | доля | доля               |
|------------------------------|---------------|------|--------------------|
| 01                           | Лавы          | 01   | Минимальная защита |
| 02                           | Полная защита | 02   | Минимальная защита |
| 03                           | Всего обороты | 03   | Минимальная защита |
| 04                           | Всего обороты | 04   | Минимальная защита |
| 05                           | Всего обороты | 05   | Минимальная защита |
| 06                           | Всего обороты | 06   | Минимальная защита |
| 07                           | Всего обороты | 07   | Минимальная защита |

### Технічна характеристика

Годовое натуральное потребление: 2700 тыс. шт.  
Клиентская группа: у рив-33  
Формат натурально-финансовый: по 5 шт.

[illegible][illegible]

