

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет медико-фармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: **«ОРГАНІЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА ДІЄТИЧНОЇ ДОБАВКИ
НА ОСНОВІ *AKKERMANSIA MUCINIPHILA*»**

Виконав: здобувач вищої освіти групи БТ621(4,6з)-01
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Біотехнологія
Віталій МАТВИЄВСЬКИЙ

Керівник: Доцент закладу вищої освіти кафедри біотехнології,
к.фарм.н, доц. Ольга КАЛЮЖНАЯ

Рецензент: Декан факультету біотехнологій Державного
біотехнологічного університету, професор кафедри
біотехнології, молекулярної біології та водних біоресурсів, к. с.-
г. н., проф. Олена ЦЕРБАК

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота присвячена організації виробництва дієтичної добавки на основі пробіотика нового покоління *A. muciniphila*. Визначено оптимальні параметри культивування та обґрунтовано склад живильного середовища, збагаченого вітамінами та мікроелементами. Сформовано повну технологічну схему, що включає багатоступеневу ферментацію, сепарацію біомаси, кріопротекцію та сублімаційне висушування. Розраховано витрати сировини та вихід продукту для пілотної серії масою 10 кг сухої біомаси з цільовим титром клітин не менше 10^9 КУО/г. Результати роботи можуть бути використані для організації вітчизняного виробництва засобів нутриціологічної підтримки пацієнтів із метаболічним синдромом, забезпечуючи імпортозаміщення пробіотичних препаратів.

Ключові слова: *Akkermansia muciniphila*, пробіотик, анаеробне культивування, ліофілізація, дієтична добавка.

ANNOTATION

The qualification work is devoted to the organization of the production of a dietary supplement based on the next-generation probiotic *A. muciniphila*. The optimal cultivation parameters were determined, and the composition of the nutrient medium enriched with vitamins and microelements was substantiated. A complete technological scheme was developed, including multi-stage fermentation, biomass separation, cryoprotection, and freeze-drying (lyophilization). Raw material consumption and product yield were calculated for a pilot batch of 10 kg of dry biomass with a target cell titer of at least 10^9 CFU/g. The results of the work can be used to organize the domestic production of nutritional support for patients with metabolic syndrome, ensuring the import substitution of probiotic drugs.

Keywords: *Akkermansia muciniphila*, probiotic, cultivation, freeze-drying, dietary supplement.

ЗМІСТ

Вступ.....	3
1 Аналітичний огляд.....	6
2 Характеристика готового продукту, сировини, матеріалів, напівпродуктів.....	12
2.1 Характеристика готового продукту.....	12
2.2 Характеристика біологічного об'єкту.....	14
2.3 Характеристика сировини.....	19
2.4 Біосинтез цільового продукту.....	26
3 Технологічна частина.....	37
3.1 Розрахунок матеріального балансу.....	37
3.2 Обґрунтування та вибір обладнання	40
3.3 Опис технологічного процесу.....	44
3.4 Схеми виробництва.....	52
3.5 Контроль виробництва.....	57
3.6 Екологічні аспекти виробництва.....	59
Висновок.....	62
Список використаної літератури.....	64
Додатки.....	71

					<i>162.01.03.00 000 ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	Організація виробництва дієтичної добавки на основі <i>Akkermansia</i> <i>tusciniiphila</i> Пояснювальна записка					
<i>Розробив</i>		<i>Матвієвський</i>						<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірив</i>		<i>Калюжная</i>							2	70
<i>Рецензент.</i>								<i>НФаУ</i>		
<i>Затвердив</i>		<i>Хохленкова</i>						<i>Кафедра біотехнології</i>		

ВСТУП

Актуальність теми. Сучасна медицина розглядає мікробіом кишечника як окремий «метаболічний орган», стан якого безпосередньо впливає на розвиток системних захворювань. Одним із найважливіших відкриттів останніх десятиліть у галузі мікробіології стала бактерія *Akkermansia muciniphila*. Цей специфічний мешканець муцинового шару кишечника відіграє критичну роль у підтримці цілісності кишкового бар'єру та регуляції обміну речовин. Клінічні дані свідчать, що дефіцит *A. muciniphila* асоціюється з розвитком ожиріння, цукрового діабету II типу, неалкогольної жирової хвороби печінки та хронічних запальних процесів [17].

Незважаючи на високий терапевтичний потенціал, створення промислових препаратів на основі цієї бактерії залишається складним біотехнологічним завданням. Це зумовлено статусом бактерії як суворого анаероба, потребою в спеціальних середовищах та високою чутливістю клітин до технологічних чинників під час концентрування та сушіння [22, 26]. Організація вітчизняного виробництва дієтичної добавки на основі *A. muciniphila* на базі вітчизняного підприємства, наприклад на ТОВ «БІОЛІК ФАРМА», що має багаторічний досвід виробництва пробіотиків, є актуальною відповіддю на світовий тренд персоналізованої превентивної медицини та завдання з імпортозаміщення високотехнологічних пробіотичних засобів.

Мета роботи полягає у обґрунтуванні та розробці технологічної схеми промислового виробництва дієтичної добавки на основі ліофілізованої біомаси *Akkermansia muciniphila*.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні завдання:

1. Провести аналіз науково-технічної літератури щодо біологічних особливостей бактерії *Akkermansia muciniphila*, її ролі в організмі людини та її

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		3

позитивного ефекту на організм людини.

2. Провести аналіз метаболітів та біоактивних речовин, що обумовлюють позитивний вплив бактерії на організм господаря.

3. Обґрунтувати склад живильного середовища та параметри технологічного режиму (температура, рН, анаеробіоз), що забезпечують оптимальний ріст біомаси *A. muciniphila* в умовах промислового культивування.

4. Виконати розрахунок матеріального балансу виробництва для пілотної серії продукту масою 10 кг сухої речовини, враховуючи витрати сировини та технологічні втрати.

5. Скласти технологічну та апаратурну схеми виробництва.

6. Визначити критичні точки процесу для забезпечення мікробіологічної чистоти та життєздатності цільового штаму в готовому продукті.

7. Здійснити екологічну оцінку запропонованої технології, включаючи заходи щодо утилізації відходів виробництва.

Об'єктом роботи є технологічний процес виробництва пробіотичної дієтичної добавки, що включає стадії приготування живильного середовища, багатоступеневої анаеробної ферментації, сепарації та сублімаційного висушування біомаси *Akkermansia muciniphila*.

Предметом роботи є процес організації виробництва, а саме штам продуцент, технологія, параметри культивування, критичні точки контролю якості, що забезпечують життєздатність цільового мікроорганізму.

Методи. Для вирішення означених завдань використано аналітичні, креслярські та розрахункові методи.

Практичне значення отриманих результатів. Практичне значення отриманих результатів полягає у розробці технології для організації промислового випуску інноваційної дієтичної добавки на основі *Akkermansia muciniphila*, що можлива для реалізації на вітчизняному підприємстві. У роботі обґрунтовано та розраховано матеріальний баланс пілотної серії з отриманням

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		4

10 кг сухої біомаси. Сформовано опис технологічного процесу, технологічна та апаратурна схеми, забезпечуючи стабільність штаму та дозволяючи досягти цільового титру життєздатних клітин не менше 10^9 КУО/г. Результати роботи можуть бути використані як практичні рекомендації для розширення асортименту вітчизняних засобів нутриціологічної підтримки пацієнтів із метаболічним синдромом та іншими порушеннями, асоційованими з дисбіозом кишечника.

Окремі результати роботи представлені на VI міжнародній науково-практичній конференції «Youth Pharmacy Science» (10-11 грудня 2025 р., м. Харків) та опубліковані в збірці тез (додаток).

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		5

1 АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

Загальна характеристика. *A. muciniphila*, комменсальна бактерія, що деградує муцин, з унікальними фізіологічними властивостями, стала основним кандидатом у пробіотики нового покоління. Вона демонструє потужну антиоксидантну здатність та широкий спектр антибіотикорезистентності. Порівняно з традиційними пробіотиками (наприклад, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, дріжджі та *Bacillus*), *A. muciniphila* має суттєві переваги: унікальну здатність до колонізації слизової оболонки, потужну протизапальну та метаболічну дію, повний набір ферментів для деградації муцину. Так, *A. muciniphila* здатна тривалий час перебувати в кишечнику, проникаючи крізь муциновий бар'єр, тоді як традиційні пробіотики зазвичай проходять транзитом, чинячи лише тимчасовий регуляторний ефект [25]. Як представник пробіотиків терапевтичного спрямування, вона експресує специфічні функціональні білки, такі як Amuc_1100, чия дія значно перевищує механізми традиційних пробіотиків, що покладаються переважно на синтез вітамінів [15, 28]. Її геном кодує цілісну систему ферментів, що дозволяє бактерії безпосередньо брати участь у регуляції гомеостазу слизової оболонки [38]. Це відрізняє її від таких штамів мікробіомів, які залежать від ферментації харчових волокон [8].

Історичні етапи та клінічне впровадження. З моменту першого виділення бактерії в Університеті Вагенінгена у 2004 році [15], дослідження пройшли шлях від клінічних спостережень до вивчення молекулярних механізмів (рис. 1.1):

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		6

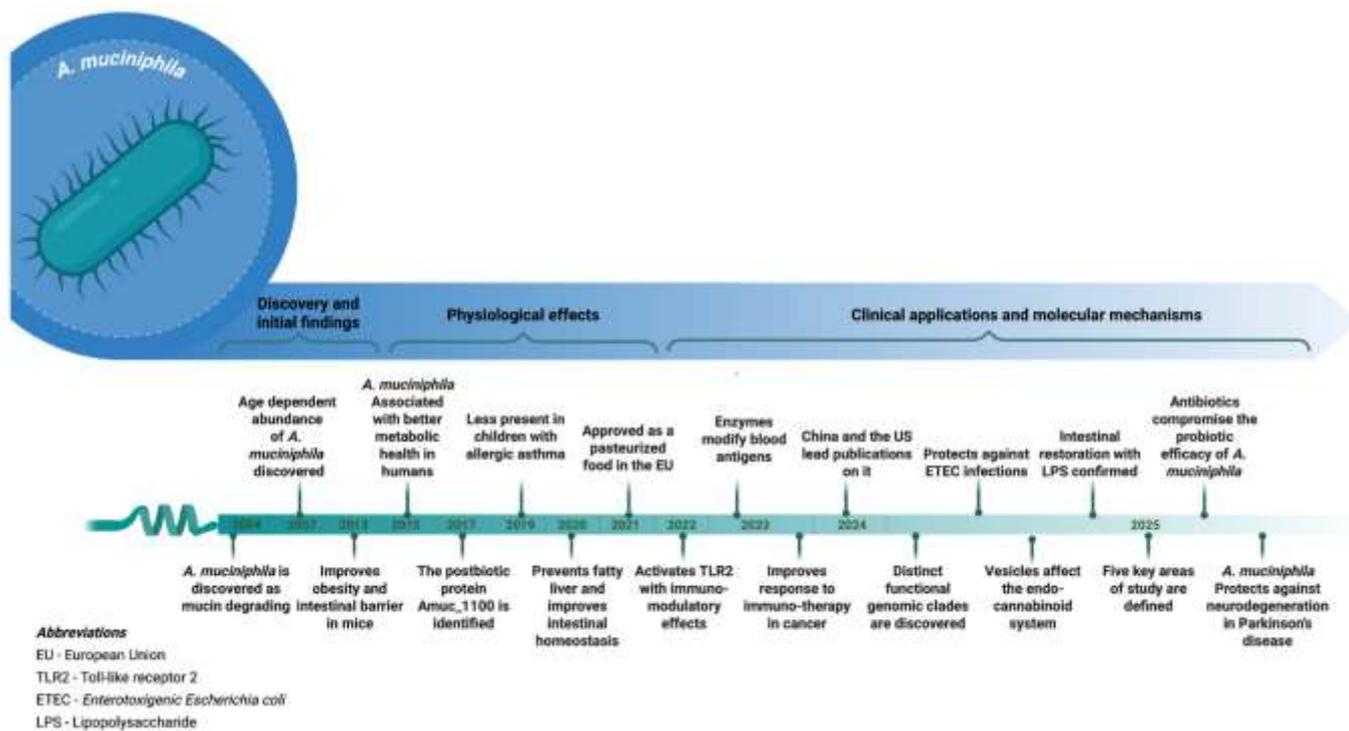


Рис. 1.1 – Історичні віхи відкриття та дослідження *A. muciniphila* (2004 – 2025 pp.) [44]

2012 рік. Група Hansen довела, що *A. muciniphila* може гальмувати прогресування автоімунного діабету;

2016 рік. Plovier та співавт. надали перші докази того, що пастеризована (інактивована) бактерія демонструє навіть вищу ефективність у лікуванні метаболічних розладів, ніж жива форма;

2019 рік. Перше клінічне випробування на людях показало, що щоденне вживання інактивованої бактерії (10^{10} КУО/день) протягом 3 місяців підвищило індекс чутливості до інсуліну на 28,6%;

2022 рік. Європейська комісія офіційно дозволила використання пастеризованої *A. muciniphila* як нового харчового продукту [22].

Антиоксидантні механізми та функціональні компоненти. *A. muciniphila* підтримує гомеостаз слизового шару через складну систему взаємодій:

- Білок Amuc_1100 активує сигнальний шлях РІЗК-АКТ та модулює

шлях Keap1-Nrf2/НО-1, що ефективно знижує оксидативний стрес. Він зберігає активність навіть при температурі пастеризації (70°C) [20, 28, 47, 55].

- Коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК) переважно бутират (до 90% від загальної кількості) та пропіонат. Вони зміцнюють епітеліальний бар'єр через пригнічення гістон-деацетилаз та стимуляцію синтезу муцину [31, 44].

- Позаклітинні везикули доставляють білки та нуклеїнові кислоти безпосередньо в клітини-мішені господарю, модулюючи імунну відповідь при низькій імуногенності [44, 47].

Роль у гомеостазі кишкового бар'єру. Бактерія реалізує концепцію «муцинолітичного симбіозу». *A. muciniphila* розщеплює олігосахариди муцину, які стають субстратом для неї самої та інших корисних бактерій. Це одночасно стимулює келихоподібні клітини до вироблення нового муцину, забезпечуючи динамічне оновлення бар'єру. Ферментативна активність бактерії знижується, коли шар слизу стає занадто тонким, що запобігає надмірному виснаженню захисного шару. Колонізація бактерією стимулює вироблення антимікробних пептидів, що перешкоджає вторгненню патогенів [54].

Системні ефекти через вісь «кишечник-органи». Антиоксидантна дія КЛЖК, що продукуються бактерією, виходить за межі кишечника, впливаючи на мозок, печінку, нирки. Так, ацетат і бутират знижують активацію мікроглії, захищаючи нейрони від оксидативного пошкодження. КЛЖК забезпечують до 30% енергетичних потреб печінки та зменшують накопичення вільних радикалів. Вісь кишечник-нирки. Активація шляху РІЗК/АКТ/mTOR (внутрішньоклітинний сигнальний шлях фосфоінозитид-3-кіназа/протеїнкіназа в/ мішень рапаміцину у ссавців) через рецептори жирних кислот полегшує стан при діабетичній нефропатії [10, 18, 53, 56].

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		8

Чинники модуляції популяції *Akkermansia muciniphila*. Рівень *A. muciniphila* можна модулювати різними біоактивними сполуками, включаючи поліфеноли (наприклад, ресвератрол, катехіни), пребіотики (наприклад, інулін, фруктоолігосахариди) та резистентний крохмаль. Ці сполуки можуть посилювати її ріст безпосередньо як субстрати або опосередковано, модифікуючи середовище кишечника та сприяючи взаємодіям крос-фідінгу (cross-feeding - перехресне годування, тип симбіотичної взаємодії між різними видами мікроорганізмів, при якому продукти життєдіяльності одного виду стають необхідним джерелом живлення або енергії для іншого) [8, 56].

Пробіотики визначаються як живі мікроорганізми, які надають користь здоров'ю при споживанні в адекватних кількостях, тоді як пребіотики - це субстрати, які селективно використовуються корисними мікроорганізмами [3, 8]. Синергія між пробіотиками, пребіотиками та мікробіотою кишечника сприяє позитивним ефектам на здоров'я, з *A. muciniphila* як ключовим кандидатом [56].

Екологічна пластичність *A. muciniphila* та її здатність до колонізації кишечника значною мірою залежать від наявності специфічних субстратів та впливу біоактивних сполук. Модуляція рівня цієї бактерії розглядається як стратегічний інструмент відновлення цілісності кишкового бар'єру та корекції метаболічних порушень.

Нестравлювані вуглеводи (пребіотики). Основним механізмом впливу пребіотичних волокон, серед яких слід виділити галактоолігосахариди (GOS), інулін, фруктоолігосахариди (FOS), полідекстрозу (PDX), резистентний крохмаль (RS2) та ксилоолігосахариди (XOS), на *A. muciniphila* є зміна мікробної екосистеми та доступності джерел вуглецю [44, 50, 56]. Будучи стійкими до ферментів верхніх відділів ШКТ, GOS досягають товстої кишки, де виступають субстратом для ферментації. Доведено, що споживання GOS сприяє зростанню *A. muciniphila* не через пряму дію, а шляхом зменшення конкуренції за муцин з бактеріями роду *Bacteroides*. Крім того, ацетат, що

									Арк.
									9
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.03.00 000 ПЗ				

виробляється *A. muciniphila*, стимулює синтез бутирату іншими таксонами (наприклад, *Eubacterium hallii*), що посилює експресію генів MUC та продукцію муцину, створюючи позитивний цикл зворотного зв'язку. Застосування інуліну демонструє значний потенціал у корекції печінкового стеатозу. У моделях на мишах додавання 10% інуліну призводило до зростання відносного рівня *A. muciniphila* з 10% до 47% протягом 8 тижнів. Це супроводжувалося відновленням експресії білків щільних контактів, що критично для запобігання ендотоксемії. Проте дані клінічних досліджень на людях свідчать про значну гетерогенність результатів, що вказує на залежність ефекту інуліну від базового складу мікробіоти реципієнта. Олігофруктоза здатна збільшувати рівень *A. muciniphila* у сліпій кишці більш ніж у 80 разів, що корелює з підвищенням чутливості до лептину та покращенням толерантності до глюкози. Полідекстроза, завдяки своїй складній розгалуженій структурі, виявляє селективний пребіотичний ефект на акермансію у здорових дорослих, що відрізняє її від простіших волокон, які підтримують переважно сахаралітичну флору. RS2 сприяє збагаченню ключових синбіотичних бактерій, тоді як ефект XOS є суворо опосередкованим. Встановлено, що XOS не може бути єдиним джерелом вуглецю для *A. muciniphila* *in vitro*, проте в умовах цілісної мікробіоти він стимулює її ріст через метаболічну кооперацію з іншими мікробами [44, 56].

Рослинні поліфеноли та антиоксиданти. Поліфенольні сполуки модулюють чисельність *A. muciniphila* через зміну редокс-стану кишечника та пряму взаємодію з мікрофлорою. Так, екстракт поліфенолів винограду (GPE) демонструє здатність збільшувати рівень *A. muciniphila* на 468% у поєднанні зі стійким зниженням рівня реактивних форм кисню. У випадку з чорницею пребіотичний ефект є специфічним для фракції олігомерних проантоціанідинів, тоді як цілий екстракт може підтримувати конкуруючі таксони [44]. Такі сполуки як кверцетин та ресвератрол виявляють синергізм з *A. muciniphila*. Синбіотичне введення бактерії з кверцетином забезпечує

						162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			10

нормалізацію інсулінорезистентності та зміну пулу жовчних кислот. Ресвератрол, у свою чергу, ефективно відновлює популяцію бактерій при колітах та метаболічному запаленні, відновлюючи функцію кишкового бар'єру [44, 45, 53].

Проведений аналіз сучасних досліджень дозволяє стверджувати, що *Akkermansia muciniphila* є унікальним пробіотиком нового покоління, який за своїми функціональними характеристиками суттєво перевершує традиційні мікробіологічні штами. Ключовою перевагою даної бактерії є її здатність до сталої колонізації муцинового шару кишечника та наявність цілісної системи ферментів для деградації муцину, що забезпечує безпосередню регуляцію гомеостазу кишкового бар'єру та системну протизапальну дію. Встановлено, що рівень популяції *A. muciniphila* в організмі можна ефективно модулювати за допомогою нестравлюваних вуглеводів, таких як галакто- та фруктоолігосахариди, інулін і полідекстроза, а також рослинних поліфенолів (ресвератрол, кверцетин), які діють синергічно, зміцнюючи антиоксидантний захист через вісь «кишечник–органи». Таким чином, результати аналітичного огляду підтверджують доцільність розробки промислової технології виробництва дієтичної добавки, що базується на культивуванні цього штаму в умовах суворого анаеробіозу з подальшою стабілізацією біомаси, що стане основою для створення ефективного вітчизняного засобу корекції метаболічних порушень.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		11

2 ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОГО ПРОДУКТУ, СИРОВИНИ, МАТЕРІАЛІВ, НАПІВПРОДУКТІВ

2.1 Характеристика готового продукту

Готовий продукт - дієтична добавка на основі ліофілізованої біомаси *Akkermansia muciniphila* штам Muc^T, ВАА-835 (обґрунтування вибору та опис його властивостей наведено у розділі 2.2). Продукт пропонується випускати у формі порошку з пребіотичними наповнювачами (інулін), розфасованого у тверді желатинові капсули (300 мг), по 30 капсул у блістері, упакованих у картонну пачку.

Нормативне регулювання:

Виробництво, обіг та маркування даної добавки здійснюється згідно із Законом України № 4122-ІХ від 05.12.2024. Відповідно до законодавства, продукт визначений як харчовий продукт, що доповнює раціон речовинами з фізіологічним ефектом. Дієтична добавка не є лікарським засобом, тому опис її дії базується на терміні «фізіологічний ефект», зумовлений структурними компонентами та продуктами метаболізму бактерії. Деякі показники якості визначені за вимогами ДФУ (Державна Фармакопея України) для забезпечення високого стандарту безпеки [1].

Характеристика активного компонента (Akkermansia muciniphila):

A. muciniphila є представником типу *Verrucomicrobia*, що складає 1–4% мікробіоти кишківника здорової людини. Її дія зумовлена як життєздатністю клітин, так і структурними елементами клітинної стінки.

Ключові чинники фізіологічного ефекту:

Білок Amuc_1100 - специфічний білок зовнішньої мембрани, який взаємодіє з Toll-подібними рецепторами (TLR2) кишківника. Він посилює щільність контактів епітелію, покращуючи бар'єрну функцію кишківника.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		12

Коротколанцюгові жирні кислоти - у процесі деградації муцину бактерія продукує оцтову (ацетат) та пропіонову кислоти.

Ацетат - слугує субстратом для інших корисних бактерій, стимулюючи вироблення бутирату.

Пропіонат - впливає на рецептори в печінці, сприяючи покращенню глюкозного обміну та модуляції апетиту.

Екзополісахариди - сприяють формуванню захисного шару слизу та імуномодуляції.

Фізіологічні ефекти дієтичної добавки:

На основі біологічних властивостей штамму Muc^T, споживання добавки забезпечує такі ефекти:

Підтримка метаболічного здоров'я - сприяє нормалізації рівня глюкози в крові та покращенню чутливості до інсуліну.

Зміцнення кишкового бар'єру - стимулює оновлення муцинового шару та зміцнює міжклітинні сполуки епітелію.

Контроль маси тіла - бере участь у регуляції ліпідного обміну та зменшенні системного запалення низької інтенсивності, асоційованого з ожирінням.

Протизапальна дія - модуляція імунної відповіді через взаємодію з лімфоїдною тканиною кишківника.

Склад дієтичної добавки:

Активна речовина - ліофілізована біомаса *Akkermansia muciniphila* Muc^T (не менше 10⁹ КУО в одній капсулі).

Допоміжні речовини (пребіотики) - інулін (як наповнювач та субстрат для мікробіоти), стеарат магнію (антиспікаючий агент).

Капсула - желатин.

Органолептичні властивості:

Зовнішній вигляд - дрібнодисперсний аморфний порошок у капсулах.

Колір - від світло-бежевого до сірувато-кремового (характерний для

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

ліофілізованих культур).

Запах - слабкий специфічний аромат поживного середовища.

Фізико-хімічні властивості:

Масова частка вологи - не більше 3,0%.

Розпадання - капсула має розпадатися у водному середовищі при температурі 37°C протягом не більше 15 хв.

Мікробіологічна чистота:

Відповідно до ДФУ 2.6, стаття 5.1.4:

Загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС): $\leq 10^3$ КУО/г.

Загальне число дріжджів та плісняви (ТУМС): $\leq 10^2$ КУО/г.

Відсутність *Escherichia coli*, *Salmonella* та *Staphylococcus aureus* у визначеній наважці.

Застосування:

Вживати по 1 капсулі на добу під час їжі. Рекомендовано для осіб з метаболічним синдромом, надмірною вагою та для загальної підтримки мікробіому.

Застереження:

Вагітним та жінкам у період лактації перед застосуванням слід проконсультуватися з лікарем.

Термін придатності та умови зберігання:

24 місяці. Зберігати у сухому, захищеному від світла місці при температурі $5 \pm 3^\circ\text{C}$ (у промисловій упаковці).

2.2 Характеристика біологічного об'єкту

Рід *Akkermansia* належить до типу *Verrucomicrobiota* грамнегативних бактерій. Більшість досліджень біології *Akkermansia* зосереджені на оригінальному штамі *Akkermansia muciniphila* МусТ (ВАА-835) [52], який був першим представником роду виділеним із людських фекалій у Нідерландах у

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

2004 році [15].

З того часу в межах роду *Akkermansia* було ідентифіковано ще два види згідно з Міжнародним кодексом номенклатури прокаріотів (International Code of Nomenclature of Prokaryotes, ICNP): *A. glycaniphila*, виділений із фекалій сітчастого пітона (штам Pyt^T), та *A. biwaensis* (типовий штам WON2089^T) [37]. Крім того, було запропоновано кілька нових видів *Akkermansia*, таких як: *Candidatus A. intestinavium*, виділений із кишечника птахів, *Candidatus A. intestinigallarum*, виділений із кишечника курей, ізоляти з кишечника людини – *A. massiliensis sp. nov.* (типовий штам Marseille-P6666^T = CSUR P6666 = СЕСТ 30548) та *Candidatus A. timonensis* (типовий штам Akk0196) [41].

З розвитком метагеноміки та секвенування геномів виявлено значну варіабельність серед різних виділених ізолятів. У 2017 році Guo з колегами запропонували поділ виду на три філогрупи (AmI, AmII, AmIII) на основі середньої ідентичності нуклеотидів (ANI) 85–91%, з відмінностями в метаболізмі, толерантності до кисню та синтезі вітаміну В12 [35]. Філогрупу AmI запропоновано поділити на AmIa (MucT) та AmIb. Подальші роботи (Kirmiz з колегами у 2020 році; Wecken з колегами у 2021 році) виявили додаткові філогрупи, включаючи AmIV, з унікальними властивостями, такими як різна продукція коротколанцюгових жирних кислот та взаємодія з господарем [27, 37]. У 2022 році Ndongo з колегами запропонували рекласифікацію, в результаті чого вісім штамів, раніше віднесених до *A. muciniphila*, було запропоновано виділити в нові види *A. massiliensis* (штам Marseille-P6666 філогрупи AmII) та *Candidatus A. timonensis* (для штамів філогрупи AmIII) через відмінності в 16S rRNA (4 базові пари в регіоні V4) та ANI <95% [43]. На основі подібних досліджень у 2023 році Kobayashi із колегами запропонували визнати філогрупу AmIV новим видом під назвою *Akkermansia biwaensis* [9]. У 2024 році Mueller з колегами представили оновлені дослідження [41], згідно з якими було підтверджено, що *A. muciniphila* слід розділити на кілька видів, включаючи *A. muciniphila*,

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

A. massiliensis та *A. biwaensis*, а також науковці запропонували:

- перейменувати філогрупу AmIa у *A. muciniphila subsp. muciniphila*, оскільки типовий штам *A. muciniphila* (Muc^T) належить саме до цього підвиду;

- назву для філогрупи AmIb змінити на *A. muciniphila subsp. communis* (*communis* - лат. «спільний, звичайний»), оскільки цей підвид частіше зустрічається серед метагеномів та ізолятів, ніж *subsp. muciniphila*; типовим штамом цієї групи є Akk1570^T, який був виділений із фекалій дитини з ожирінням.

- філогрупу AmV визнати новим видом *Akkermansia ignis* (*ignis* - лат. «вогонь», що відсилає до запалення), що обумовлено тим, що два ізоляти AmV були отримані від мишей із різними хронічними запальними захворюваннями кишечника (типовий штам - MmAkk2^T).

- філогрупу AmVI визнати видом *Akkermansia durhamii*; назва від міста Дарем (Durham, Північна Кароліна), звідки були отримані обидва ізоляти від пацієнтів (типовий штам RCC_12PD^T виділено з фекалій пацієнта з нирково-клітинною карциномою (RCC)).

Таблиця 2.1

Характеристика штамів *Akkermansia*

Номенклатура попередніх досліджень	Нова номенклатура (за [41])	Штам	Рік та джерело ізоляції, номер штаму в репозитаріях (якщо штам депоновано)	Розмір генома (м.п.о.)
<i>A. muciniphila</i> AmIa	<i>A. muciniphila</i> <i>subspecies muciniphila</i>	Muc ^T	2004 р., людські фекалії ATCC BAA-835 = DSM 22959 = CIP 107961 = JCM 33894 = BCRC 81048 = CCUG 64013	2,743
<i>A. muciniphila</i> AmIb	<i>A. muciniphila</i> <i>subspecies communis</i>	Akk1570 ^T	2024 р., людські фекалії	2,816
AmI-like		YL44	2016 р., фекалії миші DSM 26127	2,745
		m1-15	фекалії білки ATCC BAA-2869	
		Akk11	2025 р., фекалії здорових немовлят	

Номенклатура попередніх досліджень	Нова номенклатура (за [41])	Штам	Рік та джерело ізоляції, номер штаму в репозитаріях (якщо штаму депоновано)	Розмір генома (м.п.о.)
		AKM Lab-01	2025 р., людські фекалії	
		AKK-D	2025, фекалії лісного мускусного оленя	
<i>A. muciniphila</i> AmII	<i>A. massiliensis</i>	Marseille-P6666 ^T	2024 р., людські фекалії CSUR P6666 = СЕСТ 30548	3,112
		<i>A. massiliensis</i> sp. nov. (AkkerBalan ce TM)	2025 р., фекалії людини DSM 33459	3,112
<i>A. muciniphila</i> AmIII / <i>Candidatus A. timonensis</i>			2024 р.	2,956
<i>A. muciniphila</i> AmIV	<i>A. biwaensis</i>	WON2089 ^T	2023 р., фекалії людей NBRC 115679 = DSM 114407	3,213
<i>A. muciniphila</i> AmV	<i>A. ignis</i>	MmAkk2 ^T	2024 р., мишачі фекалії ATCC TSD-460	2,809
		MmAkk3	2020 р. ATCC BAA-3399	
<i>A. muciniphila</i> AmVI	<i>A. durhamii</i>	AE01SA01	2022, фекалії людини ATCC BAA-3400	
		RCC_12PD ^T	2024 р., фекалії пацієнтів з раком нирок ATCC TSD-461	3,161

Деякі штами з табл. 2.1 вже депоновані в репозитаріях, таких як ATCC (American Type Culture Collection, США), DSMZ (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Німеччина), CIP (Collection de l'Institut Pasteur, Франція), JCM (Japan Collection of Microorganisms, Японія), BCRC (Bioresource Collection and Research Center, Тайвань), CCUG (Culture Collection University of Göteborg, Швеція), багато виділених ізолятів ще знаходяться на різних етапах дослідження, депонування та комерціалізації.

Загалом, штами відрізняються за толерантністю до кисню, синтезом коротколанцюгових жирних кислот, імунною модуляцією та кореляцією з ожирінням та діабетом, серед яких група AmI на сьогодні вважається найпоширенішими в Європі та Азії та є найбільш вивченою на сьогоднішній день, хоча слід відмітити, що активні дослідження перспективного виду тривають. У цій роботі ми пропонуємо використати штам Muc, групи AmI. Цей штам депонований, має доведену безпеку (за EFSA/FAO/WHO критеріями) та використовується в пробіотиках [51]. Для придбання штаму для комерційного застосування підприємство може звернутися безпосередньо до репозитаріїв для отримання МТА (Material Transfer Agreement, Угода про передачу матеріалів) та ліцензії на комерційне використання. Також вітчизняне підприємство може розглянути співпрацю з компаніями (наприклад, Danone / The Akkermansia Company) для трансферу технологій або імпорту штаму під ліцензією.

MucT (AmIa, *A. muciniphila subspecies muciniphila*), депозитні номери: ATCC BAA-835 = DSM 22959 = CIP 107961 = JCM 33894 = BCRC 81048 = CCUG 64013). Типовий штам виду, ізольований з фекалій здорової людини (2004 рік, Derrien et al., Wageningen University, Нідерланди). Грам-негативна, анаеробна, муцин-деградуюча бактерія; продукує коротколанцюгові жирні кислоти (ацетат, пропіонат), білки Amuc_1100 (імунна модуляція via TLR2) та P9 (стимулює GLP-1); асоційований з покращенням бар'єру кишечника, зменшенням ожиріння, діабету та запалення. Геном 2,74 Mbp, G+C 55,8%; висока аеротолерантність; залежний від зовнішнього вітаміну B12. Пастеризована форма схвалена EFSA для добавок (наприклад, у продуктах The Akkermansia Company) [12, 13].

Akkermansia muciniphila - це бактерія овальної форми, суворо анаеробна, нерухома, грамнегативна та така, що не утворює ендоспор (рис. 2.1) [17].

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

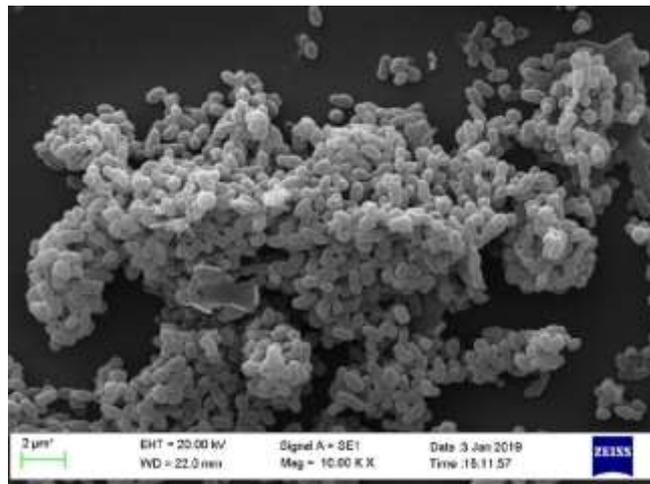
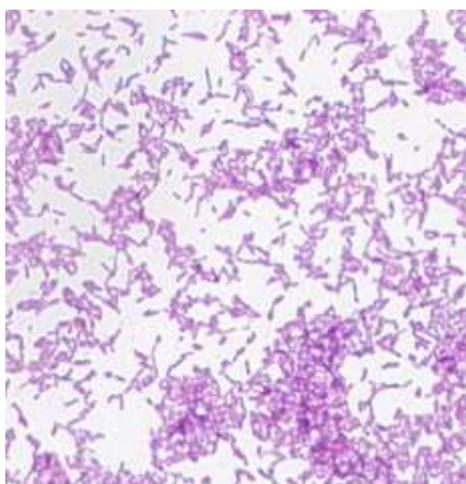


Рис. 2.1 – Світлова та сканувальна електронна мікрофотографія *Akkermansia muciniphila* (масштабна лінійка відповідає 2 мкм) [16, 17]

2.2 Характеристика сировини

Традиційно вирощування *A. muciniphila* було складним через її чутливість до кисню та потребу в середовищах тваринного походження на основі муцину. Бактерія здатна розщеплювати більшу частину муцину в кишечнику людини за допомогою різноманітних позаклітинних та внутрішньоклітинних глікозидаз, використовуючи муцин як єдине джерело вуглецю та азоту. Враховуючи обмежену доступність муцину людського походження та структурну схожість між муцином людини та свинячим шлунковим муцином, Деррієн та співавт. вперше використали свинячий муцин і стерильну рідину рубця замість людського муцину для успішної ізоляції та культивування *A. muciniphila* [15]. Відтоді середовище на основі муцину стало пріоритетним вибором для вирощування цієї бактерії, зокрема в лабораторних роботах. Так, одним з рекомендованих середовищ для культивування *A. muciniphila* Muc є середовище PYG (Peptone-Yeast extract-Glucose) модифіковане + 0,1 % муцину (склад наведено у табл. 2.2) [13].

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

162.01.03.00 000 ПЗ

Арк.

19

Склад середовищ для вирощування *Akkermansia muciniphila*

Компонент середовища	Кількість	Примітки
Середовище PYG (модифіковане) + 0,1 % муцину [13]		
Триптиказеїновий пептон	5,00 г	Інструкція з приготування: Вітамін К1, розчин геміну та цистеїн додають після кип'ятіння та охолодження (під струменем CO ₂) середовища. Встановіть рН 7,2 за допомогою 8 N NaOH. Розлийте середовище в атмосфері N ₂ та стерилізуйте в автоклаві.
Пептон	5,00 г	
Дріжджовий екстракт	10,00 г	
М'ясний екстракт	5,00 г	Сольовий розчин: CaCl ₂ x 2H ₂ O (Кальцій хлорид дигідрат): 0,25 г, MgSO ₄ x 7H ₂ O (Магній сульфат гептагідрат): 0,50 г, K ₂ HPO ₄ (Дикалій гідрофосфат): 1,00 г, KH ₂ PO ₄ (Калій дигідрофосфат): 1,00 г, NaHCO ₃ (Натрій гідрокарбонат): 10,00 г. NaCl (Натрій хлорид): 2,00 г, Дистильована вода: 1000,00 мл
Глюкоза	5,00 г	
K ₂ HPO ₄ (Дикалій гідрофосфат)	2,00 г	
Твін 80	1,00 мл	
Сольовий розчин	40,00 мл	
Резазурин	1,00 мг	
Розчин вітаміну К1	0,20 мл	
Розчин геміну	10,00 мл	Розчин геміну: Розчиніть 50 мг геміну в 1 мл 1 N NaOH; доведіть об'єм до 100 мл дистильованою водою. Зберігати в холодильнику.
Цистеїн-HCl x H ₂ O	0,50 г	Розчин вітаміну К1: Розчиніть 0,1 мл вітаміну К1 у 20 мл 95% етанолу та простерилізуйте методом фільтрації. Зберігати в холодильнику в пляшці з темного скла.
Дистильована вода	950,00 мл	Після автоклавування до середовища додають 50 мл/л освітленої рідини рубці та 0,1 % муцина
Бульйон Шедлера [13]		
Казеїновий пептон	5,66 г	Інструкція з приготування: Прокип'ятіть середовище в атмосфері CO ₂ до зміни кольору індикатора резазурину з рожевого на безбарвний. Охолодіть під струменем CO ₂ та встановіть рН 7,6. Замініть газ на N ₂ для запобігання подальшого зниження рівня рН. Розлийте у пробірки Хангейта в атмосфері N ₂ та простерилізуйте в автоклаві.
Соевий пептон	1,00 г	
Дріжджовий екстракт	5,00 г	
Суміш пептонів	5,00 г	
Глюкоза	5,83 г	
K ₂ HPO ₄ (Дикалій гідрофосфат)	0,83 г	
NaCl (Натрій хлорид)	1,66 г	
Трис(гідроксиметил)амінометан	3,00 г	
Резазурин	1,00 мг	
Гемін	0,01 г	
Цистеїн-HCl x H ₂ O (гідрохлорид L-цистеїна моногідрат)	0,40 г	
Дистильована вода	1000,00 мл	

Середовище з глюкозою, N-ацетилглюкозаміном та джерелом амінокислот (варіант для високої щільності клітин, безтваринний) [21]

Гідролізат рослинного білка (такий як гідролізат соєвого білка, гідролізат горохового білка, гідролізат пшеничного білка, гідролізат рисового білка, гідролізат бавовняного білка тощо)	0,01 - 1000 г	Композиція містить моносахарид, азотовмісну похідну моносахариду та джерело амінокислоти. Моносахарид – глюкоза, азотвмісний похідний моносахариду може бути обраний з N-ацетилглюкозаміну (Glc-NAc) та N-ацетилгалактозаміну (Gal-Nac). Джерелом амінокислоти можуть бути: дріжджові екстракти, молочні гідролізати, гідролізати рослинного білка. Додатково – треонін, амінокислоти - аланін, глутамат, пролін та серин, розчин вітамінів, мінералів. Інструкція: Розчиніть моносахарид, азотовмісну похідну, джерело амінокислот та добавки у воді. Відрегулюйте рН до 6,5-7,0 буфером. Стерилізуйте та готуйте під анаеробними умовами (газова фаза N ₂ /CO ₂ , 1,8 атм), щоб уникнути контакту з киснем. Розфасуйте в анаеробні флакони або пробірки, автоклавуйте або фільтруйте-стерилізуйте чутливі компоненти.
Триптон	32 г	
Глюкоза	4,50 г (від 0,001 мМ до 1 мМ)	
N-ацетилглюкозамін (GlcNAc) або N-ацетилгалактозаміну (Gal-Nac)	5,50 г (25 ммоль/л) (від 0,1 мМ до 500 мМ)	
Треонін	1 – 4 г (від 0,01 мМ до 100 мМ)	
KH ₂ PO ₄	0,40 г	
Na ₂ HPO ₄	1,34 г	
NaCl	0,30 г	
MgCl ₂	0,10 г	
L-цистеїн	0,40 г	
Дріжджовий екстракт (опційно)	2,00 – 5,00 г	
Дистильована вода	до 1000,00 мл	

Оптимізоване на основі базового ВНІ [49], пропонується для використання у цій роботі

Триптон	37,00 г	Інструкція: Розчиніть у дистильованій воді триптон, глюкозу, фосфати, хлориди, L-цистеїн та розчини мікроелементів. Простерилізуйте отриману базову суміш в автоклаві. Після автоклавування та охолодження середовища підтримуйте анаеробні умови (газація N ₂ /CO ₂). Додайте через стерилізуючий фільтр (0,22 мкм) розчин вітамінів. Встановіть початковий рівень рН на позначці 7,8 за допомогою стерильного розчину NaOH. На 1 літр дистильованої води додають: біотин: 2,0 мг, фолієва кислота: 2,0 мг, піридоксин-HCl (B6): 10,0 мг, тіамін-HCl (B1): 5,0 мг, рибофлавін (B2): 5,0 мг, вітамін B12 (ціанокобаламін): 0,1 мг, п-амінобензойна кислота: 5,0 мг,
Глюкоза	15,00 г	
NaHCO ₃ (Натрій гідрокарбонат)	4,00 г	
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O (Динатрій гідрофосфат додекагідрат)	1,34 г	
KH ₂ PO ₄ (Калій дигідрофосфат)	0,40 г	
L-цистеїн	0,40 г	
NH ₄ Cl (Амоній хлорид)	0,30 г	
NaCl (Натрій хлорид)	0,30 г	
CaCl ₂ (Кальцій хлорид)	0,11 г	
MgCl ₂ x 6H ₂ O (Магній хлорид гексагідрат)	0,10 г	
Розчин вітамінів	1,00 мл	

		ліпоева кислота: 5,0 мг
Розчин мікроелементів (кислотний)	1,00 мл	Кислотний розчин мікроелементів містить солі, розчинені у слабкому розчині соляної кислоти (HCl 25% - 10 мл/л), л: FeCl ₂ ·4H ₂ O: 1,5 г, ZnCl ₂ : 70 мг, MnCl ₂ ·4H ₂ O: 100 мг, H ₃ BO ₃ : 6 мг, CoCl ₂ ·6H ₂ O: 190 мг, CuCl ₂ ·2H ₂ O: 2 мг, NiCl ₂ ·6H ₂ O: 24 мг
Розчин мікроелементів (лужний)	1,00 мл	Лужний розчин мікроелементів містить солі, розчинені у слабкому розчині луку (NaOH 10 ммоль/л): Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O: 3 мг, Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O: 4 мг, Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O: 4 мг
Дистильована вода	до 1000,00 мл	

Але в промислових умовах використання тваринних середовищ суттєво обмежене через потенційні проблеми безпеки та ризики забруднення включаючи патогени, віруси, пріони. Також слід враховувати, що пробіотики для людського споживання мусять відповідати строгим стандартам безпеки, таким як GRAS (Generally Recognized as Safe) від FDA (США), QPS (Qualified Presumption of Safety) від EFSA (Європа), а тваринні середовища часто не відповідають цим вимогам. Крім цього, муцин тваринного походження (наприклад, свинячий) дорогий, обмежений у постачанні та складний у підготовці, що робить промислове масштабування неекономічним. Для *A. muciniphila*, яка вимагає високих концентрацій муцину, це призводить до низької щільності культури, порівняно з іншими пробіотиками. Ці чинники тривалий час гальмували клінічне використання *A. muciniphila* у пробіотиках та обумовили активні дослідження з розробки більш ефективних та економічних середовищ [18, 21, 22, 25, 32, 34, 40, 49] та пошук шляхів захисту субстанції у різних лікарських формах [23, 24, 29, 30, 42, 48].

Наприклад, дослідження Ottman з колегами показали, що *A. muciniphila* здатна використовувати моносахариди, отримані з муцину: фукозу, галактозу та N-ацетилглюкозамін. Поглинання цих цукрів, а також немучинового цукру глюкози, посилювалося у присутності муцину, що вказувало на необхідність

						162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			22

додаткових компонентів, отриманих з муцину, для оптимального росту. [36]. У дослідженнях Plovier з колегами тваринне середовище для вирощування *A. muciniphila* було замінили на синтетичне на основі комбінації глюкози, N-ацетилглюкозаміну, пептону та треоніну та підтвердили, що бактерії, вирощені на такому середовищі, безпечні для введення людині [20]. У своїх дослідженнях Belzer та de Vos модифікували муцинове середовище, замінивши муцин комбінацією соєвого пептону, глюкози, N-ацетилглюкозаміном, яке показало гарний ріст культури. Також вони дослідили, що ріст клітин можна стимулювати додаванням треоніна або дріжджового екстракту (YE), досягши росту клітин на рівні $OD_{600} = 7,2$ (OD_{600} – оптична щільність при 600 нм) [21].

Ці та інші дослідження показали перспективність заміни муцину як єдиного джерела азоту та вуглецю на інші компоненти, прикладом чого є бульйон Шедлера (табл. 2.2). Це середовище є досить багатим для швидкого накопичення біомаси анаеробних бактерій із чітким розподілом компонентів за призначенням. Як джерела азоту (амінокислоти та пептиди), що забезпечують бактерії будівельним матеріалом для синтезу власних білків, використовуються: казеїновий пептон (багатий на триптофан та інші амінокислоти), соєвий пептон (рослинне джерело азоту, містить багато вуглеводів та вітамінів, що стимулюють ріст), дріжджовий екстракт (потужне джерело не лише азоту, а й вітамінів групи B, нуклеотидів та мікроелементів), суміш пептонів (для забезпечення максимально широкого спектру амінокислот і пептидів різної довжини); як джерела вуглецю та енергії – глюкоза (основне і найбільш доступне джерело енергії для більшості бактерій); як регулятори рН та забезпечення сольового балансу – трис (буфер, утримує стабільний рівень рН, не даючи середовищу закислюватися під час виділення бактеріями органічних кислот у процесі росту), K_2HPO_4 (джерело фосфору для синтезу ДНК та мембранних ліпідів, додатковий буферний агент), NaCl (забезпечує осмотичний баланс); як фактори росту та специфічні

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		23

добавки - гемін (важливий для анаеробів, є джерелом заліза та необхідний для синтезу ферментів дихального ланцюга цитохромів); цистеїн-НСІ (джерело органічної сірки та відновник – знижує окисно-відновний потенціал середовища, виводячи залишки кисню); як індикатор – резаурин (у присутності кисню він рожевий, а в безкисневому середовищі стає безбарвним, забезпечує візуальний контроль того, що середовище придатне для вирощування суворих анаеробів); для створення анаеробної атмосфери та регуляції рН середовище готується у атмосфері CO₂ та N₂.

Бульйон Шедлера як і середовище PYG (модифіковане) наразі застосовуються для роботи, в першу чергу у лабораторії, із типовим депонованим штамом *A. muciniphila* Мис. PYG з додаванням рідини рубця та муцином містить специфічні кофактори, які імітують умови кишечника, що важливо для вивчення її природних властивостей. Але у середовищі PYG бактерії швидко ферментують вуглеводи, виділяючи кислоти. Без сильного буфера (як Трис у середовищі Шедлера) рН швидко падає, і ріст бактерій зупиняється раніше, ніж вичерпаються ресурси, тому в бульйоні Шедлера зазвичай можна отримати вищу щільність клітин. Тому середовище PYG використовується для виділення штамів або вивчення їх метаболізму, а для накопичення більшої кількості клітин та білка, використовують бульйон Шедлера.

Але для використання штаму у промислових умовах для отримання пробіотиків потрібно забезпечити оптимальні умови росту культури для максимального накопичення кількості клітин, тому роботи з оптимізації середовища та пошуку оптимальних компонентів для масового виробництва продовжуються. У багатьох дослідженнях було показано позитивний вплив на ріст *A. muciniphila* N-ацетилглюкозаміну (глюкозамін-6-фосфат, GlcN6P), який міститься в муцині та сприяє адаптації до слизової оболонки, [20, 21, 36], механізм дії якого було підтверджено дослідженнями van der Ark з колегами. Вони виявили, що бактерія не кодує фермент, який забезпечує перетворення

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		24

фруктозо-6-фосфату (Fru6P) на глюкозамін-6-фосфат (GlcN6P) (рис. 2.1), що є важливим для утворення пептидоглікану, тому останній має бути присутнім у середовищі для росту. На основі цих результатів автори розробили мінеральне середовище доповнене N-ацетилглюкозаміном та L-треоніном [40].

Geerlings для оптимізації вирощування *A. muciniphila* використала як джерело азоту гороховий пептон, як джерело вуглецю – глюкозу та N-ацетилглюкозамін, досягши найвищого на 2023 рік росту біомаси на рівні $OD_{600} = 15$ [34].

Незважаючи на важливість N-ацетилглюкозаміну як джерела вуглецю для росту *A. muciniphila*, для промисловості цей компонент є дорогим, тому Wu із колегами продовжили дослідження та запропонували середовище (на основі базового ВНІ) із додаванням триптонну як джерела азоту та глюкози як єдиного джерела вуглецю, яке при масштабуванні у біореакторі показало високий показник $OD_{600} = 13,03$ ($1,03 \times 10^{10}$ КУО/мл) [49]. Висока концентрація триптонну (37 г/л) та глюкози (15 г/л) у цьому середовищі спеціально розрахована на досягнення екстремально високої щільності клітин. Хоча цей показник є нижчим, ніж у дослідженнях Geerlings, слід зазначити, що це є найвищим зареєстрованим значенням при використанні глюкози як єдиного джерела вуглецю. До складу середовища входять розчини вітамінів, кислотний та лужний розчини мікроелементів, які є стандартними для вирощування суворих анаеробів. Додавання двох розчинів здійснюється для запобігання випаданню в осад певних металів (селену, молібдену), які є стабільними при різних значеннях рН. Цей набір мікроелементів забезпечує роботу ферментативних систем бактерії, зокрема глікозидаз та білків зовнішньої мембрани, які відповідають за взаємодію з організмом хазяїна. У роботі підкреслюється, що оптимізоване середовище стимулювало синтез детіобіотину (проміжна сполука біотину), що важливо для високої щільності клітин. У дослідженнях Wu із колегами ферментацію здійснювали у режимі з підживленням глюкозою та поетапним регулюванням рН. Протягом усього

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		25

процесу культивування проводилася безперервна вентиляція анаеробною газовою сумішшю (N₂:CO₂ у співвідношенні 8:2). Початковий рН середовища підтримували на рівні 7,8 за допомогою розчину NaOH. У міру росту *A. muciniphila* значення рН у середовищі знижувалося, тому проводилась регуляція на рівні не нижче 6,5–7,0. За даними цього дослідження, окрім високої щільності клітин, використання оптимізованого середовища позитивно впливає на роботу ферментативних систем бактерії, зокрема глікозидаз та білків зовнішньої мембрани (наприклад, Amuc1100), які відповідають за взаємодію з організмом хазяїна, та стимулюють синтез важливих для позитивного впливу на організм людини метаболітів. Це середовище (табл. 2.2) та метод ферментації пропонується використовувати у цій кваліфікаційній роботі для можливості реалізації на вітчизняному підприємстві.

2.4 Біосинтез цільового продукту

Позитивний вплив готового продукту – дієтичної добавки на основі пробіотика нового покоління *Akkermansia muciniphila* – пов'язаний із продуктами метаболізму цієї бактерії. Розглянемо етапи біосинтезу пробіотичним штамом метаболітів, які є ключовими у позитивній ролі добавки на мікрофлору кишечника та загальний метаболізм організму людини. Характерними метаболітами *A. muciniphila*, що сприяють зміцненню бар'єру кишечника, зменшенню запалення, покращенню метаболізму та імунної відповіді, є коротколанцюгові жирні кислоти (ацетат, пропіонат, бутират) та триптофанові похідні (індол, індол-3-оцтова кислота, індол-лактат). Крім цього, суттєвий позитивний вплив на організм господаря мають інші біоактивні речовини - поверхневі білки, секретовані білки та позаклітинні везикули бактерії, що відіграють ключову роль у зв'язках між господарем та

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		26

мікробіомом, безпосередньо взаємодіючи з клітинами господаря, проходячи через шар муцину, тим самим модулюючи сигналізацію хазяїна для забезпечення гомеостатичного балансу [40, 44].

Біосинтез метаболітів відбувається в процесі метаболізму бактерії, переважно через деградацію муцину та анаеробне бродіння.

Розщеплення муцину. *A. muciniphila* розщеплює муцин (глікопротеїн слизової оболонки кишечника) як основне джерело вуглецю та азоту. Муцин у шарі слизу, що вистилає кишковий тракт, складається з пептидного кістяка із О-зв'язаними гліканами. Пептидний кістяк багатий на треонін, серин, цистеїн і пролін, глікани складаються з різноманітних цукрових груп, що містять манозу, галактозу, фукозу та N-ацетилгексозаміни, такі як N-ацетилглюкозамін (GlcNAc) та N-ацетилгалактозамін (GalNAc). *A. muciniphila* здатна ферментувати деякі з цих цукрів, включаючи галактозу, фукозу, глюкозу, GlcNAc та GalNAc, які використовуються бактерією для отримання енергії та як джерело вуглецю (ця характеристика використовується при оптимізації живильних середовищ як описано у розділі 2.3). Деградація муцину здійснюється ферментами, такими як сіалідази та фукозидази, що вивільняє цукри, які використовуються іншими бактеріями мікрофлори. Інші ферменти (β -N-ацетилглюкозамінідази, β -галактозидази, сульфатази) вивільняють N-ацетилглюкозамін (GlcNAc) та N-ацетилгалактозамін (GalNAc), які *A. muciniphila* використовує для виробництва ацетату та пропіонату, сприяючи виробленню бутирату шляхом перехресного харчування мікроорганізмів (рис. 2.2) [44].

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		27

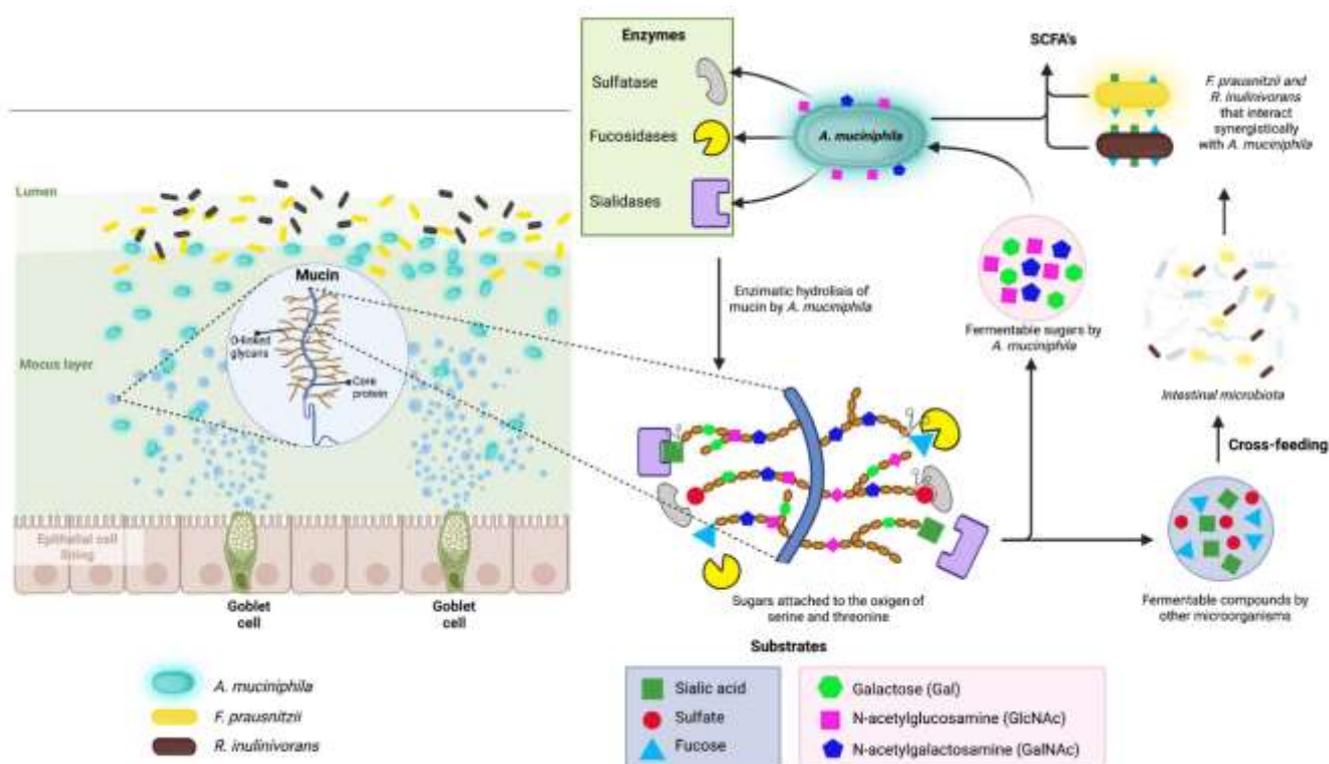


Рисунок 2.2 - Деградація муцину *A. muciniphila*: ферментативний гідроліз та мікробне перехресне живлення [44]

На рис. 2.2 ілюстровано процес розщеплення муцину - складного глікопротеїну, що утворює захисний шар слизу на епітелії кишківника. *A. muciniphila* секретує спеціалізовані ферменти (глікозил-гідролази), які відщеплюють цукри від пептидного остова муцину. На рис. показано розщеплення компонентів муцину, таких як фукоза, галактоза, N-ацетилглюкозамін (GlcNAc) та N-ацетилгалактозамін (GalNAc). Усередині клітини *A. muciniphila* ці цукри ферментуються, що призводить до утворення енергії для самої бактерії та виділення метаболітів: ацетату - основний продукт ферментації, пропіонат - утворюється через сукцинатний шлях, сукцинат - проміжний або кінцевий продукт залежно від умов (наприклад, наявності вітаміну B12). *A. muciniphila* допомагає іншим корисним бактеріям забезпечуючи мікробне перехресне живлення, зокрема забезпечує стимуляцію

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

продуцентів бутирату (ацетат і олігосахариди, які вивільняються під час розщеплення муцину, стають субстратом для інших бактерій) та синтез бутирату (бактерії-партнери використовують ацетат для вироблення бутирату (масляної кислоти). Бутират є основним джерелом енергії для колоноцитів (клітин епітелію), він стимулює вироблення нових порцій муцину та зміцнює щільні контакти між клітинами. Процес створює цикл оновлення слизу, що підтримує кишковий бар'єр у здоровому стані та запобігає запаленню [44].

Саме на цьому етапі відбувається вивільнення моносахаридів для гліколізу, який є основою для синтезу коротколанцюгових жирних кислот та інших метаболітів.

Гліколіз та синтез коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК). Моносахариди (GlcNAc, GalNAc) метаболізуються через шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса (гліколіз), перетворюючись на піруват. У *A. muciniphila* переважає анаеробний шлях, де піруват перетворюється на КЛЖК.

Характеристика основних шляхів (шлях 1 - синтез пептидоглікану та метаболізм аміноцукрів та шлях 2 - катаболізм цукрів та виробництво коротколанцюгових жирних кислот) описано у роботі van der Ark зі співавторами (рис. 2.2) [40]. Ці шляхи пов'язані з гліколізом і адаптацією до муцину, оскільки *A. muciniphila* залежить від муцин-похідних цукрів для енергії та біомаси. Потоки симульовані для субстратів: GalNAc (червоний), GlcNAc (синій), суміш GlcNAc + глюкоза (жовтий). Рисунок 2.3 демонструє, як метаболічна модель дослідження передбачає зростання на муцин-похідних субстратах, підтверджуючи адаптацію *A. muciniphila* до слизової оболонки. Відсутність GlmS (ферменту, який опосередковує перетворення фруктозо-6-фосфату (F6P) на глюкозамін-6-фосфат (GlcN6P), який є важливим для утворення пептидоглікану) робить бактерію залежною від GlcNAc, що пояснює її колонізацію кишечника.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		29

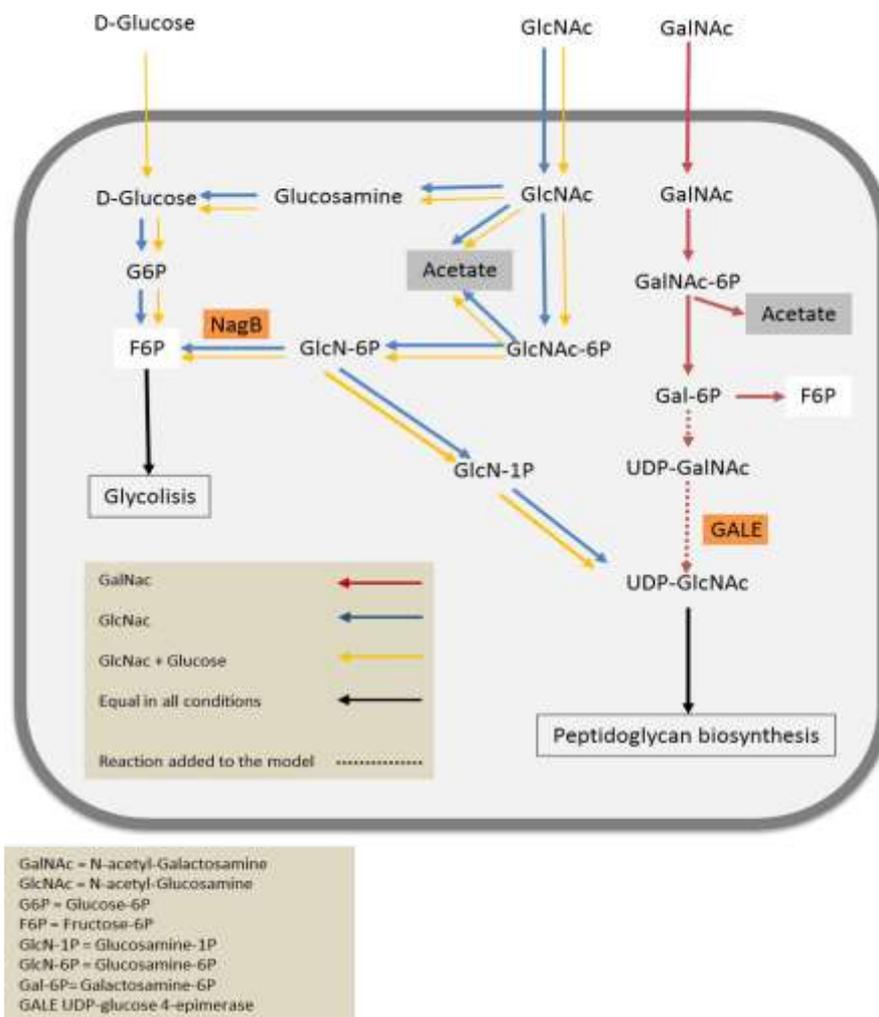


Рис. 2.3 – Біохімічні шляхи синтезу та катаболізму вуглеводів у *Akkermansia muciniphila* [40]

Шлях 1 синтезу пептидоглікану та метаболізм аміноцукрів. Інтермедіатами є: Глюкозамін-6-фосфат (Glucosamine-6-phosphate, GlcN6P) → Глюкозамін-1-фосфат (Glucosamine-1-phosphate, GlcN1P) → Уридиндифосфат -N-ацетилглюкозамин (UDP-GlcNAc) → УДП-мурамат (UDP-MurNAc) → Пептидоглікан (Peptidoglycan).

До основних ферментів, що каталізують ці реакції, відносяться:

а. Amuc-NagB (локус Amuc_1822, глюкозамін-6-фосфат деаміназа, EC 3.5.99.6) каталізує зворотну реакцію $\text{GlcN6P} \rightarrow \text{Fru6P} + \text{NH}_3$, з низьким K_m для GlcN6P, що сприяє деамінації, але не синтезу GlcN6P з Fru6P, без активності з Fru6P + глутаміном, що підтверджує відсутність GlmS-подібної

функції.

б. УДП-глюкозо-4-епімераза (Amic_1125, EC 5.1.3.2) ізомеризує UDP-GalNAc \rightarrow UDP-GlcNAc, дозволяючи використовувати GalNAc як альтернативу GlcNAc.

в. Фосфоглюкозамін мутаза (GlmM) перетворює GlcN6P на GlcN1P),

г. УДП-N-ацетилглюкозамін пірофосфорилаза (GlmU), додає УДП до GlcN1P.

Потоки на рисунку 2.3: широкі стрілки для GlcNAc (синій) і GalNAc (червоний) показують високі потоки в цьому шляху, оскільки GlcNAc з муцину використовується безпосередньо для пептидоглікану, обходячи GlmS. Суміш GlcNAc + глюкоза (жовтий) має помірні потоки, оскільки глюкоза не компенсує відсутність GlcNAc. Чорні стрілки - стабільні реакції, такі як фосфорилування GlcNAc.

Бактерія не може синтезувати GlcN6P з F6P через відсутність ферменту GlmS, тому залежить від зовнішнього GlcNAc/GalNAc з муцину. Це адаптація до слизової ніші кишечника, де муцин - основне джерело.

Шлях 2 катаболізму цукрів та виробництво КЛЖК (гліколіз та пропіонатний шлях). Інтермедіати: N-ацетилглюкозамін / N-ацетилгалактозамін (GlcNAc/GalNAc) \rightarrow Глюкозамін-6-фосфат / галактозамін-6-фосфат (GlcN6P / GalN6P) \rightarrow Фруктозо-6-фосфат (F6P) \rightarrow Гліцеральдегід-3-фосфат (Glyceraldehyde-3-phosphate, GAP) \rightarrow Піруват (Pyruvate) \rightarrow Ацетил-CoA (Acetyl-CoA) \rightarrow Ацетат / пропіонат (Acetate/Propionate).

Ферменти, що каталізують ці реакції:

а. N-ацетилглюкозамін-6-фосфат деацетилаза (NagA, EC 3.5.1.25) деацетилює N-ацетилглюкозамін-6-фосфат на глюкозамін-6-фосфат.

б. Глюкозамін-6-фосфат деаміназа (NagB, Amic_1822) перетворює глюкозамін-6-фосфат на фруктозо-6-фосфат та амоній.

в. N-ацетилгалактозамін-6-фосфат деацетилаза (AgaA, аналог NagA)

									Арк.
									31
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.03.00 000 ПЗ				

деацетилює N-ацетилгалактозамін-6-фосфат.

г. Галактозамін-6-фосфат деаміназа (Галактозамін-6-фосфат деаміназа, AgaB, аналог NagB) перетворює галактозамін-6-фосфат на фруктозо-6-фосфат та амоній.

Гліколітичні ферменти:

д. Фосфоенолпіруват-карбоксикіназа (PckA) участвує в гліколітичному шляху.

ж. Піруват-карбоксилаза (Puc) перетворює піруват на оксалоацетат.

з. Метилмалонил-СоА-мутаза (MutAB) участвує в синтезі пропіонату.

і. Ацетаткіназа (AckA) каталізує утворення ацетату з ацетил-фосфату.

к. Фосфотрансацетилаза (Pta) перетворює ацетил-СоА на ацетил-фосфат.

Потоки на рисунку 2.3: широкі стрілки для GlcNAc (синій) і GalNAc (червоний) показують високі потоки в гліколізі, з ацетат:пропіонат співвідношенням 1.5:1–2:1. Суміш GlcNAc + глюкоза (жовтий) - 1:1, GlcN - 1:2 (без зростання без глюкози). Чорні стрілки - стабільні реакції, такі як перетворення пірувату на ацетил-СоА.

Бактерія ферментує муцин-цукри для енергії, виробляючи КЛЖК (ацетат, пропіонат), які корисні для господаря (покращення бар'єру кишечника). Відсутність GlmS спрямовує GlcN6P на гліколіз замість синтезу, оптимізуючи енергію в муцин-ніші [40].

Синтез триптофанових похідних (індолів). *A. tuniciphila* метаболізує триптофан на індол та похідні – індол-3-оцтова кислота (IAA, indole-3-acetic acid), індол-3-молочна кислота (ILA, indole-3-lactic acid), індол-3-ацетальдегід (IAAld, indole-3-acetaldehyde), а також 5-гідроксиіндол-оцтова кислота (5-HIAA, 5-hydroxyindole-acetic acid), індолацетальдегід (indoleacetaldehyde) та 5-гідроксиіндолацетилгліцин (5-hydroxyindoleacetyl-glycine). Процес відбувається через такі етапи: деамінація триптофану триптофаназою (tnaA), що призводить до утворення індолу, пірувату та амонію; окислення до IAAld

									Арк.
									32
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.03.00 000 ПЗ				

альдегіддегідрогеназою; відновлення до IAA або ILA редуктазами. Гени *aad*, *tnaA* (триптофаназа) регулюють синтез, з додатковим залученням генів *IDO1* (індоламін-2,3-діоксигеназа 1), *TDO2a* (триптофан-2,3-діоксигеназа), *Kynu* (кінуреніназа) та *TRH1* (триптофан-гідроксилаза 1), які пригнічуються в мікробіотному шляху [10].

Метаболіти, що утворюються з триптофану в бактерії, є природними лігандами AhR (Aryl hydrocarbon receptor, арильний вуглеводневий рецептор) – білку у клітинах, який присутній у багатьох тканинах, особливо в кишечнику, печінці, імунних клітинах та мозку, відіграє роль у регуляції імунної відповіді, детоксикації та гомеостазі організму. Утворені бактеріальні метаболіти мають системні ефекти на організм господаря:

1. Покращення бар'єру кишечника та зменшення запалення. Активуючи AhR, метаболіти стимулюють синтез інтерлейкіну IL-22 та антимікробних пептидів. Це запобігає ендотоксемії та системному запаленню, корисно для лікування запальних захворювань кишечника, коліту та метаболічного синдрому. У моделях з високожировою дієтою використання *A. muciniphila* підвищує рівні цих метаболітів, зменшуючи хронічне запалення (TNF- α , IL-6) на 20–30% і покращуючи цілісність слизової [54].

2. Регуляція метаболізму та зменшення ожиріння. Перелічені метаболіти пригнічують КР шлях (Kynurenine pathway, кинурейновий шлях - основний шлях катаболізму триптофану в організмі людини, де близько 95% триптофану перетворюється на кінуренін та похідні; відбувається в печінці, імунних клітинах та кишечнику, впливаючи на імунітет, нейрофункції та метаболізм), переспрямовуючи триптофан на корисні шляхи, що зменшує інсулінорезистентність, стеатоз печінки та гіперліпідемію [10].

3. Нейропротекція та вплив на вісь «головний мозок-кишечник». Метаболіти модулюють серотоніновий шлях (5-НТ), збільшуючи 5-НТ у кишечнику (на 20–40% у комбінації з лактатом), що зменшує тривогу та депресію. Вони проникають у кровообіг, впливаючи на мікроглію та нейрони,

зменшуючи нейрозапалення та покращуючи когнітивні функції. У моделях стресу/тривоги використання *A. muciniphila* з лактатом відновлює баланс триптофану, знижуючи симптоми на 30–50% [38].

4. Імунна толерантність та антиоксидантний ефект. Активація AhR сприяє диференціації Т-клітин (Treg), зменшуючи аутоімунні реакції та окисний стрес. Це корисно для профілактики серцево-судинних захворювань та раку кишечника [39].

Специфічний вплив на клітини-господаря мають і окремі метаболіти, що утворюються з триптофану у *A. muciniphila*. Наприклад, IAA (індол-3-оцтова кислота) відноситься до антиоксидантів, що захищають клітини від окисного стресу, також активує AhR для посилення бар'єру кишечника та зменшення ендотоксемії, покращує метаболізм глюкози, зменшуючи інсулінорезистентність у пацієнтів з діабетом 2 типу. ILA (індол-3-молочна кислота) модулює імунну відповідь, зменшуючи запалення в печінці та кишечника; сприяє нейропротекції, знижуючи рівні маркерів депресії (наприклад, кортизолу) [10, 54].

Таким чином, метаболіти, що утворюються з триптофану, роблять *A. muciniphila* перспективним пробіотиком для лікування метаболічних, запальних та психічних розладів, з клінічним потенціалом у добавках.

Інші біоактивні компоненти. Також позитивні ефекти *A. muciniphila* опосередковані взаємодією її біоактивних компонентів із господарем, таких як білки зовнішньої мембрани (Amuc_1100, Amuc_1409), секретовані білки (P9), треоніл-тРНК-синтетаза (AmTARS), а також позаклітинні везикули [19, 46, 55].

Білок зовнішньої мембрани Amuc_1100 синтезується рибосомами як прекурсор з сигнальною послідовністю; експортується через секреторну систему до зовнішньої мембрани; інтегрується в типе IV пілюс-подібні структури під час росту бактерії в анаеробних умовах; ген Amuc_1100 у кластері генів pilus (Amuc_1098–1102). Цей пілін-подібний білок (33 кДа)

									Арк.
									34
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.03.00 000 ПЗ				

модулює імунну відповідь через TLR2 (толл-подібний рецептор 2, спеціальний білок-рецептор, який відіграє критичну роль у роботі вродженого імунітету), покращує бар'єр кишечника, зменшує запалення, ожиріння та інсулінорезистентність; антизапальний, стимулює інтерлейкін ІЛ-10 і нейротрофічний фактор мозку BDNF, полегшує тривогу та депресію [28].

Секретований білок P9 (Amuc_1631) стимулює секрецію GLP-1 (глюкагон-подібний пептид-1) в ентероендокринних клітинах, покращує метаболізм глюкози, зменшує ожиріння та діабет; анти-запальний, посилює ефекти *A. muciniphila* в моделях метаболічного синдрому. Цей невеликий пептид (близько 10–20 кДа) синтезується рибосомами з гену Amuc_1631; посттрансляційно модифікується (глікозилування або фолдинг); секретується через type II секреторну систему або як частина позаклітинних везикул під час росту в муцин-вмісному середовищі [47].

AmTARS (треоніл-мРНК-синтетаза) екстрацелюлярний фермент, анти-запальний імунний медіатор; взаємодіє з TLR2, відновлює ІЛ-10-секретуючі макрофаги, зменшує запалення; покращує метаболічний синдром, ожиріння та імунну толерантність [46].

Везикули зовнішньої мембрани містять білки (Amuc_1100, P9), ліпіди, RNA; модулюють імунітет через TLR2/4, зменшують запалення (TNF- α , ІЛ-6), покращують метаболізм глюкози; проникають у кров, впливають на печінку, мозок та імунну систему. Являють собою подвійномембранні сферичні везикули (30–350 нм); складаються з фосфоліпідів (наприклад, фосфатидилетаноламін), ліпополісахаридів (низький вміст), білків та нуклеїнових кислот. Формуються через випинання зовнішньої мембрани під час росту або стресу (муцин-дефіцит); включають накопичення пептидоглікану/ліпополісахариду в периплазмі; регулюється генами *tol-pal*; вивільняються в супернатант культури [47].

У результаті аналізу процесів біосинтезу цільових продуктів метаболізму *Akkermansia muciniphila* встановлено, що терапевтична

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		35

ефективність майбутньої дієтичної добавки базується на здатності даного штаму до специфічної деградації муцину та трансформації амінокислот. Біосинтетичний потенціал *A. muciniphila* охоплює три рівні впливу: безпосереднє зміцнення кишкового бар'єру, забезпечення трофічних зв'язків у мікробіомі та дистанційну регуляцію метаболічних процесів господаря. Розуміння цих механізмів, викладене у даному розділі, є обґрунтуванням для вибору складу та технологічних параметрів виробництва дієтичної добавки, що забезпечить її високу біологічну активність та клінічну ефективність.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		36

3 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

3.1 Розрахунок матеріального балансу

Вирощування *A. tuciniiphila* з метою максимального накопичення культури проводять на живильному середовищі, склад якого обґрунтований у розділі 2.3. Вирощування проводять у виробничій лабораторії у колбах та лабораторному біореакторі (посівному апараті на 20 л) та на ділянці ферментації у інокуляторі на 250 л та виробничому ферментері на 2000 л.

Витрати живильного середовища на всіх етапах вирощування культури наведено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Витрати живильного середовища по стадіях вирощування пробіотичної культури

Стадія	Витрати середовища на стадії, л (розрахунки у розділі 3.2)	Витрати середовища на стадії з врахуванням втрат (5 %), л
Вирощування культури в колбах	1,25	1,31
Вирощування культури у посівному апараті	10,3	10,82
Вирощування культури в інокуляторі	107,86	113,25
Вирощування культури у ферментері	1130,0	1186,50
Сума	1249,41	1311,88

Таким чином, для отримання 1 серії сухої ліофілізованої біомаси *A. tuciniiphila* масою 30 кг, потрібно 1311,88 л живильного середовища. Розрахунки виконані з урахуванням густини середовища $\rho = 1,025$ кг/л (або 1025 кг/м³) та закладених втрат на стадіях приготування. Розрахунок компонентів живильного середовища, необхідних на 1 серію наведено у табл. 3.2. та матеріальний баланс у табл. 3.3

Таблиця 3.2

Витрати компонентів середовища на 1 серію продукту

Компонент	Склад, мас. %	Витрати на 1 серію, кг
Триптон	37,00 г	48,540 кг
Глюкоза	15,00 г	19,678 кг
NaHCO ₃ (Натрій гідрокарбонат)	4,00 г	5,248 кг
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O (Динатрій гідрофосфат додекагідрат)	1,34 г	1,758 кг
KH ₂ PO ₄ (Калій дигідрофосфат)	0,40 г	0,525 кг
L-цистеїн	0,40 г	0,525 кг
NH ₄ Cl (Амоній хлорид)	0,30 г	0,394 кг
NaCl (Натрій хлорид)	0,30 г	0,394 кг
CaCl ₂ (Кальцій хлорид)	0,11 г	0,144 кг
MgCl ₂ x 6H ₂ O (Магній хлорид гексагідрат)	0,10 г	0,131 кг
Розчин вітамінів	1,00 мл	1,312 л
Розчин мікроелементів (кислотний)	1,00 мл	1,312 л
Розчин мікроелементів (лужний)	1,00 мл	1,312 л
Дистильована вода	до 1000,00 мл	до 1311,88 л

Таблиця 3.3

Матеріальний баланс приготування живильного середовища (на 1 серію)

Стадія процесу / Найменування компонентів	Вхід (кг або л)	Вихід (кг або л)	Втрати (кг або л)	Примітка
1. Підготовка робочих розчинів (Лабораторія)				
1.1. Соляна кислота (HCl, 25%)	0,135 л	0,131 л	0,004 л	Для розчину мікроелементів
1.2. Робочий луг (NaOH, 10 ммоль/л)	1,000 л	0,995 л	0,005 л	Для розчину мікроелементів
1.3. Концентрований луг (NaOH, 1 М)	2,000 л	1,980 л	0,020 л	Для корекції рН
2. Приготування стокових розчинів (Преміксів)				
2.1. Кислотний розчин мікроелементів	1,312 л	1,305 л	0,007 л	0,5% втрати при дозуванні
2.2. Лужний розчин	1,312 л	1,305 л	0,007 л	0,5% втрати при дозуванні

										Арк.
										38
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.03.00 000 ПЗ					

мікроелементів				
2.3. Розчин вітамінів (стерильний)	1,312 л	1,286 л	0,026 л	2,0% втрати на фільтрі
3. Завантаження макрокомпонентів у реактор				
Триптон	48,540 кг	48,300 кг	0,240 кг	0,5% втрати при зважуванні
Глюкоза	19,678 кг	19,580 кг	0,098 кг	0,5% при розчиненні
Натрій гідрокарбонат (NaHCO ₃)	5,248 кг	5,222 кг	0,026 кг	Втрати на стінках тари
Динатрій гідрофосфат	1,758 кг	1,749 кг	0,009 кг	0,5% втрати
L-цистеїн	0,525 кг	0,522 кг	0,003 кг	0,5% втрати
Калій дигідрофосфат	0,525 кг	0,522 кг	0,003 кг	0,5% втрати
Мінеральні солі	1,063 кг	1,058 кг	0,005 кг	0,5% втрати
4. Розчинник та стабілізація				
Дистильована вода	1250,0 л	1245,0 л	5,0 л	Випаровування при 121°C
Газова суміш (N ₂ /CO ₂)	-	-	-	Барботаж (маса не врах.)
РАЗОМ ПО СЕРІЇ	1344,68 кг	1311,88 л	32,80 кг	Загальні втрати 2,4%

Вхідна маса розрахована як сума мас усіх компонентів та води (враховуючи густину). Найбільша частка втрат припадає на стадію стерилізації (випаровування) та фільтрації термолабільних компонентів (залишковий об'єм у картриджах фільтрів). Розрахункова кількість готового середовища (1311,88 л) повністю забезпечує потреби всіх етапів культивування (від колб до промислового ферментера), враховуючи 5% запас на втрати при перекачуванні між апаратами. Для мінімізації втрат сухих компонентів на підприємстві використовують системи пневмотранспорту та завантаження через шлюзові камери безпосередньо в реактор.

При приготуванні робочих розчинів втрати мінімальні, але вони враховуються при підготовці розчинів мікроелементів. Стерилізація 1 М розчину NaOH (Операція 1.3) є критичною для підтримки асептики на фінальному етапі корекції рН.

						162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			39

Найбільші втрати присутні на стадії приготування стерильного розчину вітамінів. Втрата 2% об'єму (26 мл) пов'язана з мертвим об'ємом корпусів фільтрів та адсорбцією на мембрані. Використання азоту (N₂) під тиском дозволяє максимально витиснути розчин із системи фільтрації.

Втрата 5 л води (випаровування) є типовою для реакторів об'ємом 1500–2000 л при режимі SIP (121 С, 30 хв).

Ці розрахунки підтверджують, що обране обладнання (реактор на 2000 л) має достатній запас об'єму, що дозволяє уникнути переливання піни при інтенсивному барботажі газів на стадії 3.2.

Зведений матеріальний баланс наведено у табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Зведений матеріальний баланс виробництва (1 серія)

Стадія процесу	Вхідні компоненти	Маса/Об'єм на вході	Вихід продукту	Технологічні втрати	Примітки
1. Підготовка середовища	Сировина + Вода	1344,68 кг	1311,88 л (КР)	32,80 кг (2,4%)	Випаровування, залишки в фільтрах
2. Ферментація (багатостадійна)	Середовище + Посівний матеріал	1311,88 л + 1,3 л (колби)	1243 л (КР)	70,18 л (5%)	Метаболізм, відбір проб, втрати в лініях
3. Сепарація (Центрифугування)	Культуральна рідина (КР)	1243 л (1280 кг)	128 кг (Біопаста)	1152 кг (90%)	Видалення супернатанту (супутній продукт)
4. Кріопротекція	Біопаста + Кріопротектор (1:0,5)	128 кг + 64 кг	192 кг (Суспензія)	2,0 кг (1%)	Втрати на стінках реактора
5. Ліофілізація	Заморожена суспензія	190 кг	10,3 кг (Ліофілізат)	179,7 кг (94,5%)	Сублімація льоду (водяна пара)
6. Стандартизація та фасування	Ліофілізат + Наповнювачі	10,3 кг + 20,0 кг*	30,0 кг (Суміш)	0,3 кг (1%)	Пил при подрібненні та фасуванні
РАЗОМ ПО СЕРІЇ		1540 кг	30,0 кг суміші	-	Вихід сухої біомаси: 10 кг

Кількість наповнювачів вказана орієнтовно для отримання маси суміші, зручної для інкапсуляції.

3.2 Обґрунтування та вибір обладнання

Виробництва пробіотичної дієтичної добавки на основі *A. muciniphila* пропонується на базі ТОВ «БІОЛІК ФАРМА» - підприємства з багаторічним досвідом розробки пробіотичних препаратів. Технологічна база заводу укомплектована для випуску пробіотиків і включає мікробіологічні лабораторії, дільниці ферментації (з інокуляторами та біореакторами), цехи сепарації та центрифугування, а також потужності для ліофільного висушування, для приготування живильного середовища пропонується встановлення у цеху ЖС реактору необхідного об'єму (креслення наведено у додатку).

Готовий продукт – дієтична добавка з пробіотиком випускатиметься у капсулах або саше із вмістом сухої біомаси бактерій та додаткових пребіотичних компонентів. Розрахунок проведено за сухою біомасою бактерій, яку отримують на ділянці ліофілізації з подальшою передачею на інкапсуляцію разом із іншими компонентами капсули. За завданням до роботи планується організація пілотної серії виробництва дієтичної добавки з кількістю сухої біомаси, яка передається на наповнення, 30 кг. Виходячи із того, що у сублимаційній сушарці процес заморожування та висушування відбувається до залишкової вологості 3 %, розрахуємо кількість культуральної рідини (КР), що поступає до ліофільної сушарки. Для *Akkermansia muciniphila*, яка є дуже чутливою до кисню, підтримання залишкової вологості на рівні 2,5–3% у поєднанні з вакуумуванням або заповненням флаконів інертним газом (азотом) є обов'язковою умовою збереження її активності.

Розрахунок чистої сухої речовини (M_c , абсолютно суха маса):

$$M_c = 30 \times (1 - 0,03) = 29,1 \text{ кг.}$$

Визначення виходу біомаси з культуральної рідини ($M_{кр}$). Концентрація біомаси в КР для *A. muciniphila* у промислових умовах (при використанні оптимізованих середовищ) зазвичай становить від 15 до 30 г/л (або 1,5–3% від

									Арк.
									41
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					

маси КР). Візьмемо середнє значення виходу сухої біомаси - 2,5% ($C = 0,025$) від маси КР.

$$M_{кр} = M_c / C = 29,1 / 0,025 = 1164 \text{ кг}$$

На етапах центрифугування, промивання клітин та перенесення в ліофілізатор слід врахувати втрати (зазвичай близько 5–10% біомаси). Прийmemo коефіцієнт втрат $K = 1,1$ (10% втрат).

$$M_{заг} = 1164 \times 1,1 = 1280 \text{ кг.}$$

Оскільки середовище для пробіотиків переважно складається з води, розчинених цукрів (глюкоза, GlcNAc) та джерел азоту (пептони, казеїновий гідролізат), густина культуральної рідини зазвичай лише на 2–5% перевищує густину чистої води, приймаємо $\rho_{кр} = 1030 \text{ кг/м}^3$. Тоді об'єм КР у ферментері дорівнює:

$$V_{кр.ф.} = M_{заг} / \rho_{кр} = 1280 / 1,03 = 1243 \text{ л.}$$

У процесах мікробного синтезу потрібно врахувати коефіцієнт заповнення ферментера [4, 7], приймаємо його на рівні 0,7, звідки робочий об'єм ферментера повинен бути $V_{роб.ф.} = 1243/0,7 = 1775,7 \text{ л}$. Серед стандартних параметрів обираємо ферментер номінальним об'ємом $V_{ном.ф.} = 2,0 \text{ м}^3$ (2000 л) – діаметр апарата $D = 1400 \text{ мм}$, площа поверхні теплообміну сорочки $F_p = 6,5 \text{ м}^2$, діаметр валу мішалки $d_v = 50, 65, 80 \text{ мм}$, висота рівня рідини при $\varphi = 0,75$ $H_{ж} = 1,09 \text{ м}$, при $\varphi = 0,75$ $H_{ж} = 0,77 \text{ м}$ [4].

Загальноприйнята кількість посівного матеріалу, що подається у виробничий ферментер, складає 10 % [4], тоді кількості свіжого живильного середовища та посівного матеріалу, що подаються у виробничий ферментер складають:

$$V_{жс.ф.} = 1243/1,1 = 1130 \text{ л,}$$

$$V_{пм.ф.} = 1243 - 1130 = 113 \text{ л.}$$

Ця кількість посівного матеріалу поступає до виробничого ферментера із попереднього апарата – інокулятора, з врахуванням втрат на етапах ферментації (за завданням 5 %), кількість культуральної рідини у інокуляторі

					<i>162.01.03.00 000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		42

СТАНОВИТЬ:

$$V_{кр.і} = 113 + 113 \cdot 0,05 = 118,65 \text{ л.}$$

Тоді кількість свіжого культурального середовища та посівного матеріалу, що подаються до інокулятора, дорівнюють:

$$V_{жс.і} = 118,65 / 1,1 = 107,86 \text{ л,}$$

$$V_{пм.і} = 118,65 - 107,86 = 10,79 \text{ л.}$$

Робочий об'єм інокулятора становить:

$$V_{роб.і} = 118,65 / 0,7 = 169,5 \text{ л.}$$

За стандартними даними обираємо апарат з номінальним об'ємом $V_{ном.і} = 0,25 \text{ м}^3$ (250 л) з такими параметрами: діаметр апарата $D = 700 \text{ мм}$, площа поверхні теплообміну сорочки $F_p = 1,3 \text{ м}^2$, діаметр валу мішалки $d_B = 40 \text{ мм}$, висота рівня рідини при $\varphi = 0,75$ $H_{ж} = 0,5 \text{ м}$, при $\varphi = 0,75$ $H_{ж} = 0,38 \text{ м}$.

Посівний матеріал поступає до інокулятора із попереднього апарата – лабораторного біореактора (посівного апарата), що стоїть у виробничій лабораторії. З врахуванням втрат кількість культуральної рідини, що утворюється у посівному апараті дорівнює:

$$V_{кр.па} = 10,79 + 10,79 \cdot 0,05 = 11,33 \text{ л.}$$

Тоді кількість свіжого культурального середовища та посівного матеріалу, що подаються до посівного апарата, дорівнюють:

$$V_{жс.па} = 11,33 / 1,1 = 10,3 \text{ л,}$$

$$V_{пм.па} = 11,33 - 10,3 = 1,3 \text{ л.}$$

Робочий об'єм посівного апарата становить:

$$V_{роб.і} = 11,33 / 0,7 = 16,2 \text{ л.}$$

За каталогом фірм виробників («Промвіт» НПК Промфарм) обираємо апарат з номінальним об'ємом $V_{ном.па} = 20 \text{ л}$.

Посівний матеріал до посівного апарату поступає із колб, в яких відновлена культура *A. tuciniiphila* вирощується у термостаті. Для отримання 1,3 л культуральної рідини з урахуванням втрат – 1,365 л та коефіцієнту заповнення – 0,7 потрібно 2 колби об'ємом по 1 л. Кількість живильного

									Арк.
									43
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.03.00 000 ПЗ				

середовища, що потрібна на цій стадії, дорівнює:

$$V_{\text{жс.к}} = 1,365/1,1 = 1,25 \text{ л.}$$

Загальна кількість живильного середовища, яка потрібна для забезпечення вирощування культури на 1 серію з урахуванням втрат 5%:

$$V_{\text{жс.заг}} = 1,25 + 10,82 + 113,2 + 1186,5 = 1311,88 \text{ л.}$$

З урахуванням коефіцієнту заповнення реактору 0,7 робочий об'єм реактору для приготування заданої кількості середовища становить:

$$V_{\text{роб.р}} = 1874,11 \text{ л.}$$

За стандартними параметрами обираємо реактор номінальним об'ємом $V_{\text{ном.р}} = 2000 \text{ л.}$

3.3 Опис технологічного процесу

До передферментаційних робіт відносяться стадії підготовки обладнання та сировини, приготування робочих розчинів, приготування живильного середовища.

Приготування живильного середовища реалізується на дільниці приготування середовищ, що обладнана основним обладнанням - реакторами-змішувачами з нержавіючої сталі марки AISI 316L об'ємом 1500–2000 л з сорочкою для нагріву/охолодження, мішалкою та системою барботажу газів та допоміжним обладнанням - ваги електронні промислові, система фільтрації (картриджні фільтри 0,22 мкм), автоклав та система стерилізації на місці (SIP).

Стадія 1. Підготовка робочих розчинів кислоти та луку

Розчини готуються у лабораторії заздалегідь для корекції рН та приготування стокових розчинів мікроелементів.

Операція 1.1. Приготування робочого розчину соляної кислоти (HCl 25%)

Використовується для підкислення розчину мікроелементів. У мірну

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		44

емність з 100 мл дистильованої води обережно додають концентровану соляну кислоту (37%) у кількості, необхідній для отримання 25% концентрації. Перемішують і охолоджують.

Операція 1.2. Приготування робочого розчину гідроксиду натрію (NaOH 10 ммоль/л)

Використовується для приготування лужного розчину мікроелементів. Наважку 0,4 г NaOH розчиняють у 1 л дистильованої води.

Операція 1.3. Приготування концентрованого розчину NaOH (1 М)

Використовується для корекції рН середовища. Готують шляхом розчинення відповідної наважки лугу у воді. Розчин підлягає стерилізації (автоклавуванню).

Стадія 2. Приготування стокових розчинів

Ці операції проводяться в лабораторії. Використовується скляний та нержавіючий посуд з магнітними мішалками.

Операція 2.1. Приготування кислотного розчину мікроелементів (1,312 л)

Цей розчин запобігає випаданню в осад важких металів.

У 1,2 л дистильованої води додають 13,1 мл 25% соляної кислоти (HCl).

Послідовно розчиняють солі у таких кількостях (розраховано на 1,312 л):

$\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$: 1,968 г

$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$: 249,3 мг

$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$: 131,2 мг

ZnCl_2 : 91,8 мг

$\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$: 31,5 мг

H_3BO_3 : 7,9 мг

$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$: 2,6 мг.

Доводять об'єм до 1,312 л водою. Розчин зберігають при +4 °С.

Операція 2.2. Приготування лужного розчину мікроелементів (1,312 л)

Містить мікроелементи, стабільні в лужному середовищі.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		45

До 1,2 л слабого розчину лугу (NaOH, 10 ммоль/л). Розчиняють
КОМПОНЕНТИ:

$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$: 3,94 мг

$\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$: 5,25 мг

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$: 5,25 мг

Доводять об'єм до 1,312 л.

Операція 2.3. Приготування розчину вітамінів

Потрібно отримати 1,312 л стерильного розчину термолабільних факторів росту для асептичного внесення у ферментер. Оскільки на 1 л середовища вноситься 1 мл вітамінного розчину, потрібно приготувати концентрат. Розрахунок проведено з урахуванням 2% технологічних втрат на фільтрації.

Компонент	Наважка на 1 л розчину	Витрати на серію (1,312 л з врахуванням втрат)
Біотин	2,0 мг	2,68 мг
Фолієва кислота	2,0 мг	2,68 мг
Піридоксин-НСІ (В6)	10,0 мг	13,38 мг
Тіамін-НСІ (В1)	5,0 мг	6,69 мг
Рибофлавін (В2)	5,0 мг	6,69 мг
Вітамін В12	0,1 мг	0,13 мг
п-Амінобензойна кислота	5,0 мг	6,69 мг
Ліпоева кислота	5,0 мг	6,69 мг
Дистильована вода	до 1000 мл	до 1,312 л

На аналітичних вагах (з точністю до 0,01 мг) проводять наважку вітамінів. Рекомендується використовувати метод «наважки у наважці» або попередньо приготовані розведення. У колбу з темного скла наливають 1,1 л дистильованої води. Першою розчиняють ліпоеву кислоту (з незначним підігрівом до 30°C). Додають інші вітаміни. Рибофлавін та фолієва кислота мають обмежену розчинність у нейтральному середовищі. Для їх повного

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		46

розчинення рН розчину обережно коригують до 7,0–7,2 за допомогою крапель 0,1 М розчину NaOH. Після повного розчинення всіх компонентів об'єм розчину доводять дистильованою водою до позначки 1,312 л.

Оскільки всі компоненти руйнуються при автоклавуванні, використовується метод мембранної фільтрації. Розчин подається на стерилізуючий фільтр (діаметр пор 0,22 мкм). У промислових масштабах використовується установка з картриджним фільтром, виготовленим із полієфірсульфону (PES) - цей матеріал має низьку адсорбцію вітамінів. Процес проводиться під тиском стерильного азоту (N₂) для уникнення контакту вітамінів із киснем повітря (запобігання окисленню).

Готовий стерильний розчин збирається у стерильну ємність-приймач. Внесення у ферментер відбувається асептично через спеціальний порт після того, як основне живильне середовище в апараті охолоне до 37–38°C.

Вимоги до процесу. Захист від світла - вітаміни B2, B12 та фолієва кислота є фоточутливими. Усі операції проводяться при приглушеному освітленні або у посуді з темного скла (янтарного кольору). Температурний режим - приготування проводиться при кімнатній температурі, тривале зберігання готового розчину не рекомендується (до 12 годин при +4...+8°C).

Цей розчин забезпечує бактерію *A. muciniphila* необхідними кофакторами для синтезу амінокислот та реалізації пропіонатного шляху метаболізму, що є важливим для якості дієтичної добавки.

Стадія 3. Приготування живильного середовища

Операція 3.1. Приготування базової суміші (термостабільні компоненти)

У реактор заливають 80% від необхідної кількості дистильованої води (1050 л), нагрівають до 40-50 °C для прискорення розчинення триптон. При постійному перемішуванні додають наступні компоненти:

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

Компонент	Маса на серію	Роль у середовищі
Триптон	48,540 кг	Основне джерело азоту
Глюкоза	19,678 кг	Основне джерело вуглецю та енергії
Натрій гідрокарбонат	5,248 кг	Буферна система та джерело CO ₂
Динатрій гідрофосфат	1,758 кг	Фосфатний буфер
L-цистеїн	0,525 кг	Відновник (знижує окислювально-відновний потенціал)
Калій дигідрофосфат	0,525 кг	Джерело фосфору та калію
Мінеральні солі (NH ₄ Cl, NaCl, CaCl ₂ , MgCl ₂)	Разом 1,063 кг	Осморегуляція та макроелементи

Перемішування до повного розчинення при температурі 20–25°C. Після розчинення додають 1,312 л кислотного та 1,312 л лужного розчинів мікроелементів. Об'єм доводять водою до мітки.

Операція 3.2. Стерилізація середовища

Базову суміш стерилізують при 121°C протягом 20–30 хв. У промислових умовах це робиться безпосередньо в реакторі шляхом подачі гострої пари в сорочку (метод SIP). Середовище охолоджують до температури культивування (37°C). Оскільки *A. muciniphila* є суворим анаеробом, через товщу середовища починають барботувати стерильну газову суміш (N₂/CO₂ у співвідношенні 80:20). Це витісняє залишковий кисень. Процес триває до повного видалення розчиненого кисню, що контролюється датчиком pO₂.

Операція 3.3. Внесення термолабільних компонентів

Вітаміни руйнуються при нагріванні, тому їх вводять методом стерильної фільтрації. Розчин вітамінів у кількості 1,312 л пропускають крізь мембранний фільтр з розміром пор 0,22 мкм під тиском стерильного азоту у потік охолодженого стерильного середовища.

Операція 3.4. Корекція рН та фінальна стабілізація

Доведення рН до оптимального значення для росту *Akkermansia* рН 7,8 здійснюють стерильним розчином NaOH (1 М). Контроль здійснюють за допомогою вбудованого в реактор стерилізованого рН-електрода. Середовище перемішують протягом 10–15 хв для гомогенізації під постійним тиском

										Арк.
										48
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.03.00 000 ПЗ					

інертного газу, після чого воно готове до передачі в інокулятор або ферментер.

Витрати на 1 серію (1311,88 л): сухі компоненти (вагові) – 77,7 кг сировини, рідкі компоненти (об'ємні) - 3,936 л (вітаміни та два розчини мікроелементів), енергоносії - пара під тиском (2 атм), очищена стиснена газова суміш (N₂/CO₂).

Параметри контролю процесу: якість розчинення - візуально через оглядове скло, температура стерилізації - 121,0 ± 0,5 °С, тиск у реакторі - 0,1–0,2 бар (після охолодження для підтримки стерильності), фінальний рН - 7,8 ± 0,05.

Після завершення цих етапів готове середовище асептично перекачується на необхідну стадію процесу.

До ферментаційних стадій відносяться стадії вирощування культури у лабораторії (колби та лабораторний біореактор) та у дільниці ферментації (інокулятор та виробничий ферментер). Процес проходить етапно для нарощування титру клітин. *A. muciniphila*, потребує суворих анаеробних умов.

Стадія 4. Культивування та ферментація *A. muciniphila*

Процес проходить етапно для нарощування титру клітин. *A. muciniphila* потребує суворих анаеробних умов.

Операція 4.1. Лабораторний етап (Колби та посівний апарат)

Обладнання - термостат анаеробний, колби (2 шт. по 1 л), лабораторний біореактор (20 л). Культивування проводять при температурі 37 ± 0,5 °С, безперервній газациї сумішшю N₂/CO₂. Тривалість: 24–28 годин до досягнення титру ≥ 10⁸ КУО/мл.

Контроль якості - мікроскопія мазка (чистота культури), вимірювання оптичної густоти (OD₆₀₀).

4.2. Інокуляція та основна ферментація

Обладнання - інокулятор (250 л), виробничий ферментер (2000 л). Ферментацію проводять при температурі 37 ± 0,5 °С, безперервній газациї сумішшю N₂/CO₂, автоматичній підтримці на рівні рН 6,5–7,0 (додаванням

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		49

стерильного NaOH або Na₂CO₃) та перемішуванні (низькошвидкісне (60–100 об/хв) для запобігання стресу клітин).

Контроль - аналіз споживання глюкози, рівень розчиненого кисню (повинен бути 0%).

Післяферментаційні стадії містять стадії концентрування біомаси, отримання сухого порошку, отримання капсульної маси та пакування.

Стадія 5. Концентрування біомаси

Обладнання - тарілчастий сепаратор (серії Westfalia). Процес проводять за умов - швидкість центрифугування 10000 x g, температура охолодження +4 °С, швидкість потоку 150–200 л/год. В результаті отримуємо концентровану біомасу. Вхід - 1280 кг КР. Вихід - 128 кг вологої клітинної пасти (вміст сухих речовин 20–25%) та 1152 кг відпрацьованого супернатанту.

Контроль - повнота осадження (відсутність клітин у супернатанті).

Стадія 6. Кріопротекція та заморожування

Оскільки ліофілізація може пошкодити мембрани бактерій, до біомаси додають захисні речовини - стерильний розчин кріопротекторів (сахароза, лактоза або знежирене молоко) у співвідношенні 1:0,5 до біомаси. Обладнання - реактор-змішувач (250 л) з сорочкою охолодження. Проводять за умов - швидке заморожування до температури -45 °С ... -50 °С, перемішування 30 хв при 10 °С. Вхід - 128 кг пасти + 64 кг стерильного розчину (цукроза + желатоза). Вихід - 192 кг суспензії для заморожування

Стадія 7. Ліофільне висушування

Обладнання - сублімаційна сушарка (ліофілізатор) з площею полиць, достатньою для розміщення біомаси. Первинне сушіння здійснюють при вакууму 0,1–0,2 мбар, температура полиць поступово піднімається від -40 °С до 0 °С. Вторинне сушіння забезпечує видалення зв'язаної вологи при +20 °С ... +25 °С. Вхід - 190 кг суспензії (розлитої на піддони шаром 10–15 мм). Вихід - 10,0 кг сухої біомаси (3% вологи) + залишки кріопротектора (враховані в загальній масі ліофілізату).

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		50

Контроль якості - залишкова волога (2,5–3%), життєздатність клітин, датчики температури продукту та глибини вакууму.

Стадія 8. Подрібнення та стандартизація

Отриманий сухий ліофілізат потребує перетворення на рівномірний порошок. Обладнання - млин-дезінтегратор (в асептичному виконанні), змішувач порошоків. Змішування біомаси з пребіотиками (інулін, фруктоолігосахариди) для отримання заданої концентрації у капсулі проводять за умов роботи в ламінарній зоні, контроль вологості повітря в приміщенні (<30%).

Стадія 9. Капсулювання та пакування

На автоматичній капсульній машині здійснюється наповнення твердих желатинових капсул отриманою сумішшю. Вторинне пакування у блістери або флакони з інертним газом (азотом) здійснюється на блістерній лінії.

Контроль якості - середня маса капсули, герметичність пакування, розпадання капсули.

Готовий продукт контролюють за показниками наведеними у табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Контроль якості готового продукту

Показник	Метод контролю	Вимога
Зовнішній вигляд	Візуальний	Дрібнодисперсний порошок у капсулі
Кількість живих клітин	Посів на середовище ВНІ/Mucin	$\geq 10^9$ КУО/г
Залишкова волога	Метод Карла Фішера	2,5 – 3,0 %
Чистота	Мікробіологічний посів	Відсутність патогенів (<i>Salmonella</i> , <i>S. aureus</i>)
Герметичність	Вакуумний тест блістерів	Повна герметичність

3.4 Схеми виробництва

*Вихідна сировина,
проміжна продукція та
матеріали*

Виготовлення дієтичної добавки на основі
A. muciniphila

*Контроль у
процесі
виробництва*

Соляна кислота, вода
дистильована

**Стадія 1. Підготовка робочих розчинів
кислоти та лугу**
Операція 1.1.
**Приготування робочого розчину соляної
кислоти**
Лабораторний посуд

Маса та об'єм
компонентів,
концентрація

Гідроксид натрію, вода
дистильована

Операція 1.2.
**Приготування робочого розчину
гідроксиду натрію**
Лабораторний посуд

Маса та об'єм
компонентів,
концентрація

Гідроксид натрію, вода
дистильована

Операція 1.3.
**Приготування концентрованого розчину
NaOH**
Автоклав, лабораторний посуд

Маса та об'єм
компонентів,
концентрація

**Стадія 2. Приготування стокових
розчинів**

FeCl₂ x 4H₂O, CoCl₂ x
6H₂O, MnCl₂ x 4H₂O,
ZnCl₂, NiCl₂ x 6H₂O,
H₃BO₃, CuCl₂ x 2H₂O,
соляна кислота з 1.1

Операція 2.1.
**Приготування кислотного розчину
мікроелементів**
Лабораторний посуд

Маса та об'єм
компонентів,
температура та час
зберігання

Na₂SeO₃ x 5H₂O,
Na₂WO₄ x 2H₂O,
Na₂MoO₄ x 2H₂O,
розчин лугу з 1.2

Операція 2.2.
**Приготування лужного розчину
мікроелементів**
Лабораторний посуд

Маса та об'єм
компонентів,
температура та час
зберігання

Біотин, фолієва кислота,
піридоксин-hcl (b6),
тіамін-hcl (b1),
рибофлавін (b2), вітамін
b12, п-амінобензойна
кислота, ліпоева кислота
дистильована вода

Операція 2.3.
Приготування розчину вітамінів
Лабораторний посуд

Маса та об'єм
компонентів,
умови проведення
розчинення, pH,
стерильність

**Стадія 3. Приготування живильного
середовища**

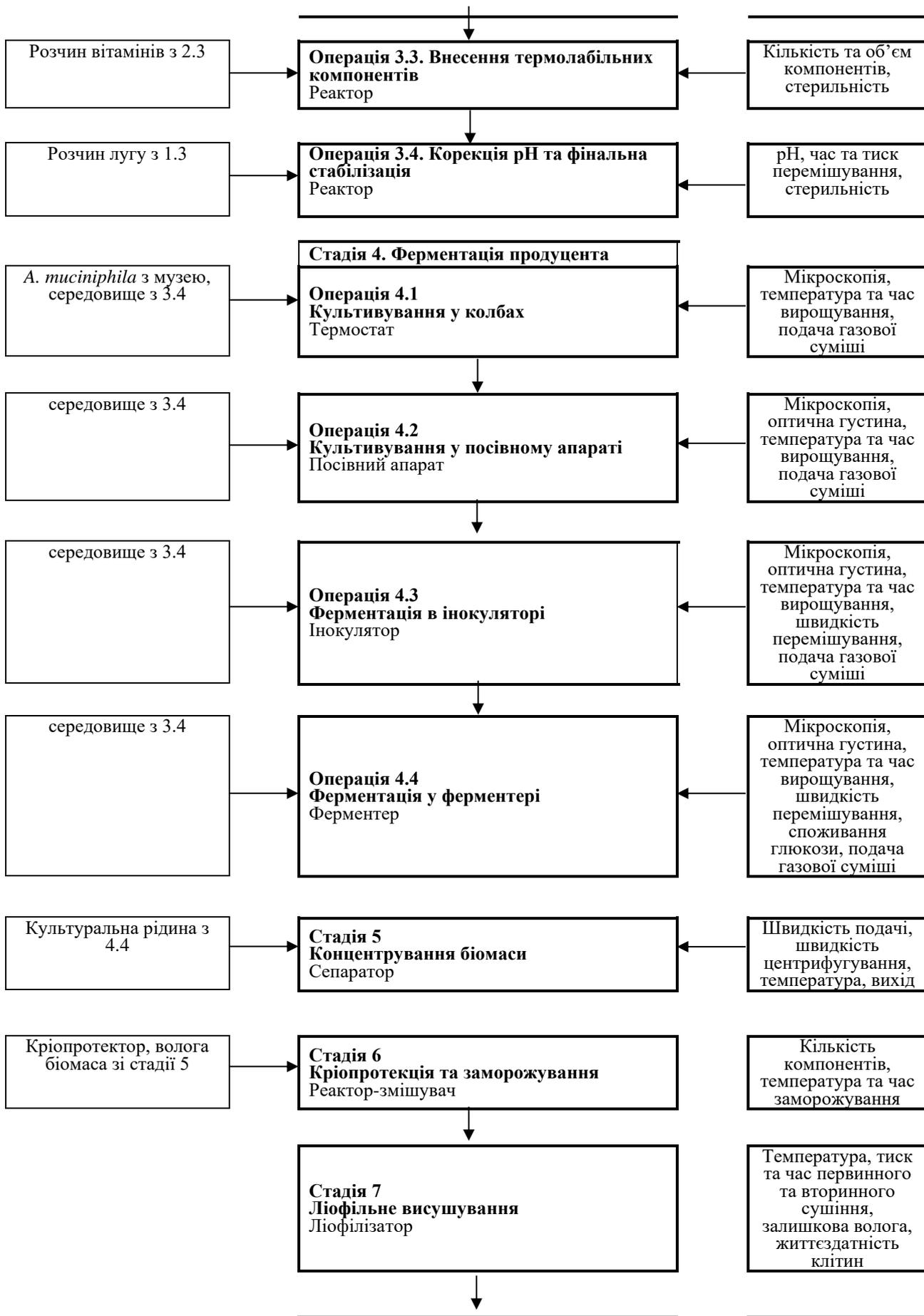
Триптон
Глюкоза
Натрій гідрокарбонат
Динатрій гідрофосфат
L-цистеїн
Калій дигідрофосфат
Мінеральні солі (NH₄Cl,
NaCl, CaCl₂, MgCl₂),
вода дистильована,
кислотний з 2.1 та
лужний з 2.2 розчини
мікроелементів

Операція 3.1.
Приготування базової суміші
Реактор

Маса та об'єм
компонентів,
температура, час
та швидкість
перемішування
при розчиненні

Операція 3.2. Стерилізація середовища
Реактор, система SIP

Температура та час
стерилізації,
температура
охолодження,
кількість газової
суміші



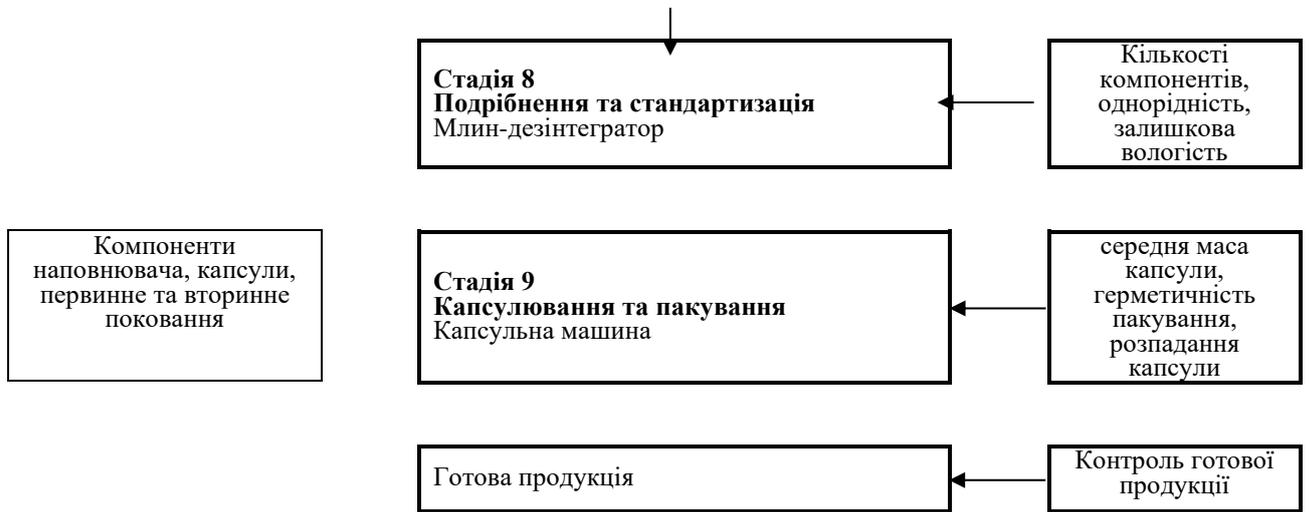


Рис. 3.2 – Технологічна схема виробництва дієтичної добавки з пробіотиком

Апаратурна схема наведена на рис. 3.3, креслення апаратурної схеми у додатку.

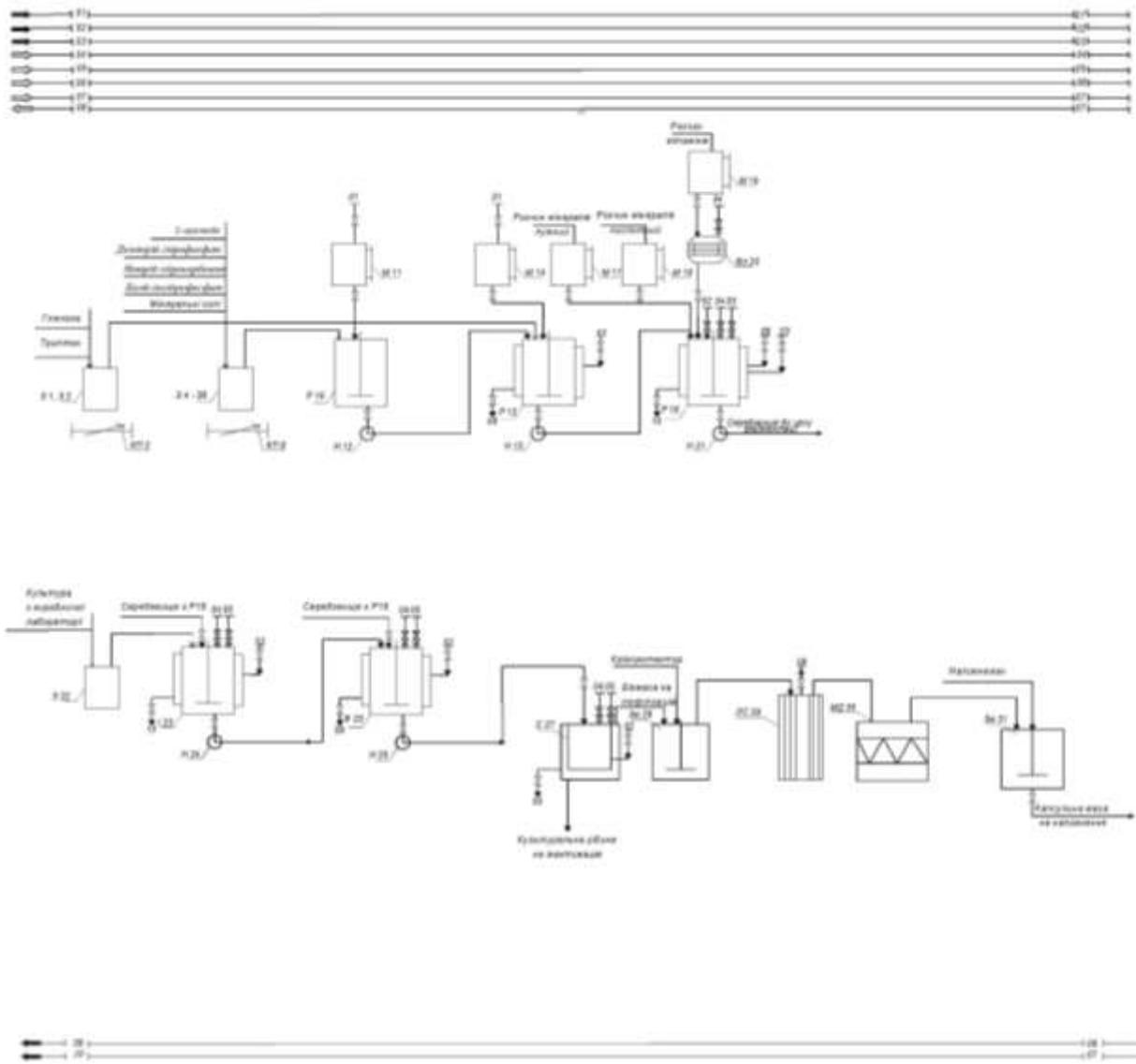


Рис. 3.6 – Апаратурна схема виробництва дієтичної добавки з пробіотиком

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

162.01.03.00 000 ПЗ

Арк.

55

Специфікація основного технологічного обладнання

Стадія процесу	Найменування обладнання	Технічна характеристика	Кількість	Призначення
Приготування середовища	Реактор-змішувач СРЗ-2000	$V_{ном} = 2,0 \text{ м}^3$, матеріал AISI 316L, сорочка нагріву, мішалка (100 об/хв)	1 шт.	Розчинення компонентів, стерилізація (SIP)
Стерильна фільтрація	Фільтраційна установка (Sartorius/Pall)	Картридж 0,22 мкм, корпус із нерж. сталі, робочий тиск до 3 бар	1 шт.	Стерилізація вітамінів та термолабільних добавок
Ферментація (I етап)	Лабораторний біореактор	$V_{ном} = 20 \text{ л}$, контроль рН, pO_2 , Т, аерація азотом	1 шт.	Нарощування посівного матеріалу (лабораторія)
Ферментація (II етап)	Інокулятор	$V_{ном} = 250 \text{ л}$, анаеробне виконання, автоматична подача луку	1 шт.	Підготовка промислового інокуляту
Ферментація (III етап)	Виробничий ферментер	$V_{ном} = 2000 \text{ л}$, барботаж N_2/CO_2 , тензометрична система зважування	1 шт.	Основне культивування біомаси
Концентрування	Сепаратор тарілчастий (Westfalia)	Продуктивність до 500 л/год, фактор розділення (g) до 12000	1 шт.	Виділення клітинної біомаси з КР
Кріопротекція	Змішувач-охолоджувач	$V_{ном} = 250 \text{ л}$, якірна мішалка, охолодження до $+4 \text{ }^\circ\text{C}$	1 шт.	Змішування пасти з кріопротекторами
Заморожування	Камера шокової заморозки	Температурний режим до $-50 \text{ }^\circ\text{C}$, швидкість охолодження $1 \text{ }^\circ\text{C/хв}$	1 шт.	Підготовка продукту до ліофілізації
Сушіння	Ліофільна сушарка (субліматор)	Площа полиць $10\text{--}12 \text{ м}^2$, конденсор на 150 кг льоду, вакуум $< 0,1 \text{ мбар}$	1 шт.	Отримання сухої біомаси (волога 3%)
Подрібнення	Млин-дезінтегратор асептичний	Продуктивність 50 кг/год, розмір фракції $100\text{--}200 \text{ мкм}$	1 шт.	Гомогенізація ліофілізату
Стандартизація	Змішувач порошків («П'яний бочонок»)	$V_{ном} = 100 \text{ л}$, герметичне виконання	1 шт.	Змішування біомаси з пребіотиками
Фасування	Капсульна машина (автомат)	Продуктивність 20 000 капс/год, точність дозування $\pm 2\%$	1 шт.	Наповнення твердих капсул

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

162.01.03.00 000 ПЗ

Арк.

56

3.5 Контроль виробництва

Таблиця 3.3

Контроль критичних стадій і проміжної продукції

Номер	Критичні точки (критичні стадії, операції)	Критичні параметри і характеристики якості	Одиниця виміру	Критерій прийнятності
K1	Стадія 1. Приготування середовища	1. Кількість компонентів (Триптон, Глюкоза та ін.) 2. Однорідність розчину 3. Температура стерилізації 4. Час стерилізації 5. Швидкість барботажу N ₂ /CO ₂ 6. рН після корекції 7. Стерильність	1. кг/л 2. - 3. °C 4. хв 5. л/хв 6. од. 7. -	1. Згідно з матбалансом 2. Прозорий, без осаду 3. 121 ± 1 4. 20–30 5. 2–5 (до рO ₂ =0) 6. 7,8 ± 0,05 7. Стерильно
K2	Стадія 2. Підготовка посівного матеріалу (колби та ПА)	1. Властивості A. muciniphila (морфологія) 2. Кількість середовища у колбах/ПА 3. Температура вирощування 4. Час вирощування 5. Концентрація клітин	1. - 2. л 3. °C 4. год 5. КУО/мл	1. Грамнегативні овальні палички 2. 1,25 (колби) / 10,3 (ПА) 3. 37 ± 0,5 4. 24–28 5. Не менше 10 ⁸
K3	Стадія 3. Вирощування інокуляту (Інокулятор 250 л)	1. Чистота культури 2. Кількість середовища 3. Об'єм інокуляту (ПМ) 4. Температура вирощування 5. рН під час процесу 6. Кількість	1. - 2. л 3. л 4. °C 5. од. 6. КУО/мл	1. Відсутність сторонньої флори 2. 107,86 3. 10,79 4. 37 ± 0,5 5. 6,5–7,0 6. Не менше 10 ⁹

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

162.01.03.00 000 ПЗ

Арк.

57

		клітин		
K4	Стадія 4. Виробниче культивування (Ферментер 2000 л)	1. Кількість середовища 2. Кількість інокуляту 3. Температура вирощування 4. Рівень розчиненого кисню (pO ₂) 5. рН (автоматична підтримка) 6. Час культивування	1. л 2. л 3. °C 4. % 5. од. 6. год	1. 1130 2. 113 3. 37 ± 0,5 4. 0 (повна анаеробіоз) 5. 6,8 ± 0,2 6. 48
K5	Стадія 5. Сепарація (Відділення біомаси)	1. Кількість КР на сепарацію 2. Температура охолодження КР 3. Швидкість центрифугування 4. Маса отриманої біопасті	1. л 2. °C 3. g / об/хв 4. кг	1. 1243 2. 4 ± 2 3. 10000–12000 4. 128 ± 5
K6	Стадія 6. Кріопротекція та заморожування	1. Кількість кріопротектора 2. Однорідність суспензії 3. Температура заморожування 4. Час витримки при t заморозки	1. л 2. - 3. °C 4. год	1. 64 (згідно з балансом 1:0,5) 2. Повна гомогенність 3. Мінус 45–50 4. 12–18
K7	Стадія 7. Ліофілізація (Сублимаційне сушіння)	1. Глибина вакууму 2. Температура нагріву полиць (вторинна) 3. Час повного циклу 4. Залишкова вологість продукту 5. Вихід ліофілізату	1. мбар 2. °C 3. год 4. % 5. кг	1. 0,05–0,15 2. 25 ± 2 3. 48–60 4. 2,5–3,0 5. 10,0 ± 0,3
K8	Стадія 8. Капсулювання та пакування	1. Співвідношення Біомаса : Пребіотик	1. - 2. мг 3. - 4. %	1. 1 : 2 (згідно з рецептурою) 2. 300 ± 5% 3. Повна (вакуум-тест)

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

162.01.03.00 000 ПЗ

Арк.

58

зnezараженню в автоклавах при 132°C перед подальшою утилізацією спеціалізованими організаціями або повторним використанням.

На стадіях ліофілізації та фасування екологічні ризики мінімізуються використанням енергоефективного обладнання та замкнутих систем аспірації з HEPA-фільтрами, які вловлюють дрібнодисперсний пил біомаси.

Впровадження системи безрозбірного миття (CIP-станції) дозволяє суттєво зменшити витрати води та агресивних дезінфектантів за рахунок їх рециркуляції. Загальна екологічна стратегія підприємства ТОВ «БІОЛІК ФАРМА» при випуску даного продукту базується на принципах ресурсозбереження та суворого дотримання вимог екологічного законодавства України, зокрема Закону України «Про охорону навколишнього природного середовища» та міжнародних стандартів ISO 14001, що гарантує відсутність негативного впливу на навколишні екосистеми при штатному функціонуванні лінії.

До загальної екологічної стратегії виробництва також включено чіткий регламент поводження з бракованою продукцією та використаною упаковкою, що є невід'ємною частиною системи управління якістю та екологічного менеджменту. Бракована продукція, яка може виникнути на стадіях інкапсуляції або пакування (наприклад, капсули з порушеною цілісністю, негерметичні блістери або партії з відхиленням за середньою масою), підлягає обов'язковому збору в спеціальні марковані контейнери «Брак». Оскільки продукт містить життєздатні мікроорганізми, такий брак класифікується як біологічно активний відхід і перед утилізацією проходить процедуру денатурації або термічної обробки для унеможливлення потрапляння штаму у довкілля. Використана первинна упаковка, що безпосередньо контактувала з продуктом (залишки блістерної фольги, ПВХ-плівки), збирається окремо та передається на спалювання в установках із системами очищення димових газів.

Вторинна та третинна упаковка, зокрема картонні пачки, групові коробки

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		60

та паперові вкладиші-інструкції, які не відповідають стандартам маркування або були пошкоджені під час логістичних операцій всередині цеху, спрямовуються на повторну переробку як макулатура. Такий підхід дозволяє замкнути цикл обігу паперових ресурсів та суттєво зменшити об'єми відходів, що підлягають захороненню на полігонах.

Крім того, на підприємстві впроваджено систему вхідного контролю тари від постачальників, що мінімізує накопичення надлишкової упаковки. Весь процес поводження з браком та відходами упаковки документується згідно з вимогами GMP та екологічними стандартами, що забезпечує повну простежуваність та унеможлиблює несанкціоноване використання відбракованих компонентів або їх негативний вплив на санітарний стан територій.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		61

ВИСНОВОК

У кваліфікаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та розв'язання практичного завдання щодо організації промислового виробництва дієтичної добавки на основі *Akkermansia muciniphila*. Результати роботи дозволяють зробити наступні висновки:

1. За результатами аналізу літературних джерел встановлено, що *A. muciniphila* є унікальним представником мікробіоти, який відіграє ключову роль у підтримці цілісності кишкового бар'єру та метаболічного здоров'я людини. Визначено, що основною складністю її промислового використання є статус суворого анаероба, що потребує спеціалізованого обладнання та суворого контролю газового складу середовища.

2. Встановлено, що позитивний вплив бактерії на організм господаря зумовлений дією специфічних метаболітів, зокрема коротколанцюгових жирних кислот, похідних індолу, білків зовнішньої мембрани та секреторних білків. Ці сполуки активують сигнальні шляхи, що знижують системне запалення та підвищують чутливість тканин до інсуліну, що обґрунтовує доцільність створення препаратів на основі *A. muciniphila*.

3. Обґрунтовано параметри культивування: для забезпечення максимального виходу біомаси визначено оптимальну температуру (37°C) та рівень рН (7,0–7,8). Склад живильного середовища оптимізовано шляхом виключення муцину та включення специфічних субстратів (глюкози, пептону та дріжджового екстракту), збагачених вітамінно-мінеральним комплексом для підтримки росту анаеробного штаму.

4. На основі розрахунків матеріального балансу для пілотної серії готового продукту визначено кількісні характеристики витрат сировини. Встановлено, що загальний вихід продукту з урахуванням технологічних втрат на етапах сепарації та ліофілізації відповідає проектним нормам, що підтверджує доцільність запропонованої схеми.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		62

5. Розроблено технологічну та апаратурну схеми виробництва. Вибране основне обладнання відповідає сучасним вимогам фармацевтичної галузі та стандартам GMP.

6. Визначено критичні точки контролю (ККТ), серед яких основними є: герметичність системи на стадії ферментації, залишкова вологість біомаси після ліофілізації (не більше 3%) та титр життєздатних клітин у готовому продукті (не менше 10^9 КУО/г) тощо. Це гарантує стабільну якість та біологічну активність дієтичної добавки.

7. Здійснено екологічну оцінку реалізації технології виробництва дієтичної добавки на базі вітчизняного підприємства ТОВ «БІОЛІК ФАРМА».

Таким чином, поставлена мета роботи досягнута, а розроблена технологічна схема може бути використана для практичного впровадження виробництва пробіотиків нового покоління в Україні.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Державна Фармакопея України. Доповнення 5 / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2021. 424 с.
2. Екологічна біотехнологія : навч. посіб. : у 2 кн. / О. В. Швед та ін. Львів : Львів. політехніка, 2018. Кн. 1. 424 с.
3. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія : підручник. 2-ге вид., допов. і перероб. Київ : НУХТ, 2010. 632 с.
4. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Львів : Львів. політехніка, 2004. Ч. 1 : Ферментація. 240 с.
5. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Львів : Львів. політехніка, 2004. Ч. 2 : Обробка культуральних рідин. 296 с.
6. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Львів : Львів. політехніка, 2004. Ч. 3 : Основи проектування мікробіологічних виробництв. 252 с.
7. Технологічне обладнання біотехнологічної і фармацевтичної промисловості : підруч. для вищ. навч. закл. / М. В. Стасевич та ін. Львів : Новий Світ–2000, 2018. 410 с.
8. Технологія пробіотиків : підручник / С. О. Старовойтова та ін. Київ : НУХТ, 2012. 318 с.
9. Akkermansia biwaensis sp. nov., an anaerobic mucin-degrading bacterium isolated from human faeces / Y. Kobayashi et al. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2023. Vol. 73(1). DOI: 10.1099/ijsem.0.005697.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		64

10. Akkermansia muciniphila alleviates metabolic disorders through gut microbiota-mediated tryptophan regulation / F. Zhang et al. *AMB Express*. 2025. Vol. 15(181). DOI: 10.1186/s13568-025-01986-3.

11. Akkermansia muciniphila as a Potential Guardian against Oral Health Diseases: A Narrative Review / M. H. Anderson et al. *Nutrients*. 2024. Vol. 16(18). P. 3075. DOI: 10.3390/nu16183075.

12. Akkermansia muciniphila Derrien et al. BAA-835™ : American Type Culture Collection. URL: <https://www.atcc.org/products/baa-835> (Date of access: 10.11.2025).

13. Akkermansia muciniphila Derrien et al. 2004 emend. Hahnke et al. 2016 DSM 22959: Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. URL: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-22959> (Date of access: 10.11.2025).

14. Akkermansia muciniphila Encapsulated in Calcium-Alginate Hydrogelated Matrix: Viability and Stability over Aerobic Storage and Simulated Gastrointestinal Conditions / D. Machado et al. *Gels*. 2023. Vol. 9(11). P. 869. DOI: 10.3390/gels9110869.

15. Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium / M. Derrien et al. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004. Vol. 54. P. 1469-1476. DOI: 10.1099/ijs.0.02873-0.

16. Akkermansia muciniphila GMB0476 / GMBANK. URL: <https://www.gmbank.org/product-page/gmb0476> (Date of access: 10.11.2025).

17. Akkermansia muciniphila is a promising probiotic / T. Zhang et al. *Microbial Biotechnology*. 2019. Vol. 12(6). P. 1109–1125. DOI: 10.1111/1751-7915.13410.

18. Akkermansia muciniphila: promises and pitfalls for next-generation beneficial microorganisms / Y. Liu et al. *Arch Microbiol*. 2025. Vol. 207(4). P. 76. DOI: 10.1007/s00203-025-04263-w.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		65

19. Akkermansia muciniphila secretes a glucagon-like peptide-1-inducing protein that improves glucose homeostasis and ameliorates metabolic disease in mice / H. S. Yoon et al. *Nat. Microbiol.* 2021. Vol. 6. P. 563–573. DOI: 10.1038/s41564-021-00880-5.

20. A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice / H. Plovier et al. *Nat Med.* 2017. Vol. 23. P. 107–113. DOI: 10.1038/nm.4236.

21. Belzer C., de Vos W. M. 2016. PatentWO2016177801A1. Method of culturing Akkermansia.

22. Bibliometric analysis of research trends and prospective directions of Akkermansia muciniphila from 2010 to 2024 / Y. Wang et al. *Front. Microbiol.* 2025. Vol. 16. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1569241_

23. Biointerfacial self-assembly generates lipid membrane coated bacteria for enhanced oral delivery and treatment / Z. Cao et al. *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10(1). P. 5783. DOI: 10.1038/s41467-019-13727-9.

24. Biomaterials coating for on-demand bacteria delivery: selective release, adhesion, and detachment / J. Liu et al. *Nano Today.* 2021. Vol. 41. DOI: 10.1016/j.nantod.2021.101291.

25. Cheng D., Xie M. A review of a potential and promising probiotic candidate - Akkermansia muciniphila. *Journal of Applied Microbiology.* 2020. Vol. 130(6). P. 1813–1822. DOI: 10.1111/jam.14911_

26. Commensal obligate anaerobic bacteria and health: production, storage, and delivery strategies / J. C. Andrade et al. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020. Vol. 8. P. 550. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00550.

27. Comparative Genomics Guides Elucidation of Vitamin B12 Biosynthesis in Novel Human-Associated Akkermansia Strains / N. Kirmiz, et al. *Appl Environ Microbiol.* 2020. Vol. 86(3). P. 02117-02119. DOI: 10.1128/AEM.02117-19.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

28. Crystal structure of monomeric Amuc_1100 from *Akkermansia muciniphila* / L. Mou et al. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 2020. Vol. 76(4). P. 168–174. DOI: 10.1107/S2053230X20004124.

29. Decorating bacteria with a therapeutic nanocoating for synergistically enhanced biotherapy / W. Hou et al. *Small.* 2021. Vol. 17(37). P. e2101810. DOI: 10.1002/sml.202101810.

30. Encapsulation of the therapeutic microbe *Akkermansia muciniphila* in a double emulsion enhances survival in simulated gastric conditions / C. H. Kees et al. *Food Research International.* 2017. Vol. 102. P. 372–379. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.09.004.

31. Fakhri Ravari A., Nguyen M. H. The Role of *Akkermansia muciniphila* in Human Health: A Clinical Review. *Medicine and Pharmacology.* 2025. URL: <https://www.preprints.org/manuscript/202509.2367> (Date of access: 17.12.2025).

32. Fleishman C. *Akkermansia muciniphila*: A Next-Generation Probiotic Comes of Age. 2024. URL: <https://ipa-biotics.org/akkermsia-muciniphila-a-next-generation-probiotic-comes-of-age/> (Date of access: 15.12.2025).

33. Gastrointestinal self-adaptive and nutrient self-sufficient *Akkermansia muciniphila*-Gelatin porous microgels for synergistic therapy of ulcerative colitis / Y. Zhang et al. *ACS Nano.* 2024. Vol. 18(39). P. 26807–26827. DOI: 10.1021/acsnano.4c07658.

34. Geerlings, S. Y. A rising star: A comprehensive approach to *Akkermansia muciniphila* ecosystems, interactions and applications. Thesis of doctor, 2023, Wageningen University, 333.

35. Genome sequencing of 39 *Akkermansia muciniphila* isolates reveals its population structure, genomic and functional diversity, and global distribution in mammalian gut microbiotas / X. Guo et al. *BMC Genomics.* 2017. Vol. 18(800). DOI: 10.1186/s12864-017-4195-3.

36. Genome-scale model and omics analysis of metabolic capacities of *Akkermansia muciniphila* reveal a preferential mucin-degrading lifestyle / N.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		67

Ottman et al. *Appl Environ Microbiol.* 2017. Vol. 83. P. 01014–17. DOI: 10.1128/AEM.01014-17.

37. Genotypic and Phenotypic Diversity among Human Isolates of *Akkermansia muciniphila* / B. Becken et al. *mBio.* 2021. Vol. 12(3). P. 00478-21. DOI: 10.1128/mBio.00478-21.

38. Gut-derived lactic acid enhances tryptophan to 5-hydroxytryptamine in regulation of anxiety via *Akkermansia muciniphila* / M. Pan et al. *Gut Microbes.* 2025. Vol. 17(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2447834>.

39. Health and Disease: *Akkermansia muciniphila*, the Shining Star of the Gut Flora / Ch. Xue et al. *Research.* 2023, Vol. 6. DOI: 10.34133/research.0107.

40. Model-driven design of a minimal medium for *Akkermansia muciniphila* confirms mucus adaptation / K. C. H. van der Ark et al. *Microb Biotechnol.* 2018. Vol. 11. P. 476–485. DOI: 10.1111/1751-7915.13033

41. Pangenomic analysis identifies correlations between *Akkermansia* species and subspecies and human health outcomes / K. D. Mueller et al. *Microbiome Res Rep.* 2024. Vol. 3(33). DOI: 10.20517/mrr.2024.09.

42. Polymeric films for the encapsulation, storage, and tunable release of therapeutic microbes / K. Qiu et al. *Adv. Healthcare Mater.* 2020. Vol. 9(6). P. e1901643. DOI: 10.1002/adhm.201901643.

43. Reclassification of eight *Akkermansia muciniphila* strains and description of *Akkermansia massiliensis* sp. nov. and *Candidatus Akkermansia timonensis*, isolated from human feces / S. Ndongo et al. *Scientific Reports.* 2022. Vol. 12. P. 21747. DOI: 10.1038/s41598-022-25873-0.

44. Response of *Akkermansia muciniphila* to Bioactive Compounds: Effects on Its Abundance and Activity / J. A. Temis-Cortina et al. *Fermentation.* 2025. Vol. 11(8). P. 427. DOI: 10.3390/fermentation11080427.

45. Sanjiwani M. I. D., Aryadi P. H., Semadi M. S. Review of Literature on *Akkermansia muciniphila* and its Possible Role in the Etiopathogenesis and Therapy

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		68

of Type 2 Diabetes Mellitus. *J. ASEAN Fed. Endocr. Soc.* 2022. Vol. 37(1). P. 69–74. DOI: 10.15605/jafes.037.01.13.

46. Secreted Akkermansia muciniphila threonyl-tRNA synthetase functions to monitor and modulate immune homeostasis / S. M. Kim et al. *Cell Host Microbe*. 2023. Vol. 31. P. 1021–1037. DOI: 10.1016/j.chom.2023.05.007.

47. Segers A., de Vos W. M. Mode of action of Akkermansia muciniphila in the intestinal dialogue: role of extracellular proteins, metabolites and cell envelope components. *Microbiome Res Rep.* 2023. Vol. 2(6). <https://doi.org/10.20517/mrr.2023.05>.

48. Spray-drying encapsulation of the live biotherapeutic candidate Akkermansia muciniphila DSM 22959 to survive aerobic storage / J. C. Barbosa et al. *Pharmaceuticals*. 2022. Vol. 15(5). P. 628. DOI: 10.3390/ph15050628.

49. Strategies for high cell density cultivation of Akkermansia muciniphila and its potential metabolism / H. Wu et al. *Microbiol Spectr.* 2023. Vol. 12(1). P. 02386-23. DOI: 10.1128/spectrum.02386-23.

50. Synthetic consortia of nanobody-coupled and formatted bacteria for prophylaxis and therapy interventions targeting microbiome dysbiosis-associated diseases and co-morbidities / K. Timmis et al. *Microb. Biotechnol.* 2019. Vol. 12(1). P. 58–65. DOI: 10.1111/1751-7915.13355.

51. The Akkermansia Company : official site. URL: <https://www.theakkermansiacompany.com/> (Date of access: 10.11.2025).

52. The Biology of Akkermansia / E. R. Hughes et al. *Annual Review of Microbiology*. 2025. Vol. 79(1). P. 287–310. DOI: 10.1146/annurev-micro-051524-032131.

53. Therapeutic potential of Akkermansia muciniphila in non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review / P. Asghari et al. *BMC Gastroenterology*. 2025. Vol. 25(1). P. 822. DOI: 10.1186/s12876-025-04436-3.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		69

54. The role of Akkermansia muciniphila in maintaining health: a bibliometric study / F. Gao et al. *Front. Med.* 2025. Vol. 12. <https://doi.org/10.3389/fmed.2025.1484656>.

55. The secreted protein Amuc_1409 from Akkermansia muciniphila improves gut health through intestinal stem cell regulation / K. Eun-Jung et al. *Nat Commun.* 2024. Vol. 15(2983). DOI: 10.1038/s41467-024-47275-8.

56. Ye W.-Y., Cai Y. Akkermansia muciniphila: a microbial guardian against oxidative stress–gut microbiota crosstalk and clinical prospects. *Journal of Translational Medicine.* 2025. Vol. 23(1). P. 1169. DOI: 10.1186/s12967-025-07149-z.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		70

ДОДАТКИ



Міністерство
охорони здоров'я
України

Національний
фармацевтичний
університет



СЕРТИФІКАТ

Цим засвідчується, що

Матвієвський В.Ю.

**Науковий керівник:
Калюжная О.С.**

брав(ла) участь у роботі VI Всеукраїнської
науково-практичної конференції
з міжнародною участю

**YOUTH
PHARMACY
SCIENCE**

Ректор НФаУ,
д. фарм. н., проф.



Олександр КУХТЕНКО

10-11 грудня 2025 р.
м. Харків
Україна

Висновки. Отже, обеліски є перспективним класом віроїдоподібних РНК-елементів, широко поширених у мікробіомах людини та навколишнього середовища. Вони утворюють унікальну спіральну структуру, кодують нові білки та колонізують бактерії без шкідливого впливу на ріст хазяїна. На сьогодні доведено їхню роль у розширенні уявлень про РНК-віром та еволюцію генетичних елементів. Ймовірно, у майбутніх дослідженнях обеліски можуть стати основою для вивчення мікробіомної терапії, оскільки їхня присутність у 10% людських зразків вказує на потенціал для регуляції бактеріальної активності.

ПЕРСПЕКТИВНІСТЬ ОРГАНІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА ДІЄТИЧНОЇ ДОБАВКИ НА ОСНОВІ *AKKERMANSIA MUCINIPHILA*

Матвієвський В.Ю.

Науковий керівник: Калужная О.С.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

kalyuzhnayao.s@gmail.com

Вступ. Організація виробництва дієтичної добавки на основі *Akkermansia muciniphila* є актуальною в контексті сучасних проблем здоров'я, пов'язаних з метаболічними розладами, ожирінням, діабетом 2 типу та запальними захворюваннями кишечника. З моменту первинного виділення *A. muciniphila* в університеті Вагенінгена у 2004 р. клінічні та доклінічні дослідження виявили, що бактерія є ключовим коменсальним мікроорганізмом кишкового мікробіому, який деградує муцини, сприяючи підтримці бар'єрної функції кишечника, виробленню коротколанцюгових жирних кислот (таких як ацетат, пропіонат і бутират) та модуляції імунної відповіді. Ця бактерія демонструє захисну роль через активацію антиоксидантних шляхів (наприклад, Nrf2 через секрецію метаболітів та активацію антиоксидантних ферментів супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази) та зменшення запалення через активацію шляху TLR2/NF-κB. У клінічних дослідженнях (наприклад, NCT02637115, NCT03893422) використання *A. muciniphila* (живої або пастеризованої) призводить до зниження ваги, покращення глюкозного гомеостазу, зменшення глікованого гемоглобіну, ліпідів та запалення, особливо в пацієнтів з метаболічними синдромами.

Мета дослідження. Аналіз сучасних тенденцій в організації виробництва дієтичних добавок з пробіотиками, зокрема на основі бактерії *Akkermansia muciniphila*, для подальшої розробки технологічної схеми для вітчизняних підприємств.

Матеріали та методи. Аналіз та систематизація наукових публікацій з відкритих джерел (PubMed, PMC, ScienceDirect), сайтів компаній-виробників (The Akkermansia Company) та патентних баз (Google Patents).

Результати дослідження. З огляду на глобальну епідемію ожиріння та зростання інтересу до пробіотиків нового покоління, тема має високий потенціал для інновацій у нутрицевтиках та персоналізованій медицині. Бібліометричний аналіз показує стрімке зростання публікацій, з ключовими напрямками досліджень – метаболічні захворювання (ожиріння, діабет 2 типу), хронічні хвороби нирок, кишково-мозковий зв'язок (Паркінсон, Альцгеймер) та запалення кишечника. Патенти підкреслюють комерційний інтерес, наприклад, до використання штамів для лікування ожиріння та метаболічних розладів. Так, патент WO2020076136A2 описує штам *A. muciniphila* SNUG-61027 (KCTC 13530BP), його культуру, супернатант, екстракти та білок B2UM07, що індукують IL-6, GLP-1 для лікування

метаболических розладів. Патент US20180094233A1 фокусується на вдосконаленні культивування *A. muciniphila*, зокрема безтваринному культивуванні для застосування як лікарського засобу, дієтичної добавки або харчового продукту. Інші патенти (наприклад, WO2014075745A1) охоплюють використання штамів для лікування метаболических розладів, а патенти від The Akkermansia Company – пероральне застосування продуктів на основі штаму MucT™ для ожиріння та глюкозного метаболізму, зокрема добавки з пастеризованим штамом MucT разом із хромом, екстрактом зеленого чаю, рибофлавіном та вітаміном D3. Сучасні технології виробництва пробіотиків на основі *A. muciniphila* фокусуються на оптимізації культивування, стабілізації та доставці, з акцентом на безтваринні середовища для забезпечення високої біомаси та безпеки, адже продукти тваринного походження можуть містити забруднювачі вірусного, пріонного або бактеріального походження, або містити алергени, антигени пептиди чи інші небажані продукти, що можуть вважатися непридатними для культивування *A. muciniphila* для подальшого застосування як харчового або фармацевтичного продукту у людей. Наприклад, розроблено середовища без муцину, що включають моносахариди (глюкозу 0.001–1 М, оптимально 10–15 г/л), азотовмісні похідні (N-ацетилглюкозамін 0.001 мМ–1 М), джерела амінокислот (наприклад, соєвий гідролізат 0.01 г/л–1 кг/л) та тіонін (0.01–100 мМ). Культивування проводиться в анаеробних умовах при 20–40°C (оптимально 36–38°C), рН 6.0–7.0 (ідеально 6.5), з буфером (рН 5.5–8.0, оптимально 6.6) та добавками (цистеїн 0.1–2%, вітаміни), досягаючи щільності OD600 до 7.2, що відповідає кількості клітин більше 10⁹ КУО (колонієутворювальних одиниць)/мл. Для досягнення ще вищої щільності (OD600 = 13.03) застосовують ферментацію з підживленням з глюкозою (15 г/л початково, загалом 72.74 г/л), триптоном (37 г/л) та NaHCO₃ як буфер, з контролем рН (7.8–7.0 на експоненційній фазі, 6.5–7.0 пізніше) для мінімізації накопичення органічних кислот. Для стабілізації *A. muciniphila* проводяться дослідження в напрямку вдосконалення систем доставки, наприклад, використовують мікроінкапсуляцію на основі кальцію хлориду, натрію карбонату, інуліну та натрію альгіну.

Висновки. Виробництво дієтичних добавок на основі *A. muciniphila*, зокрема і у комбінації з пребіотичними компонентами (інулін, рослинні екстракти), має високий потенціал для лікування метаболических розладів та покращення імунної відповіді, а організація їхнього виробництва на вітчизняних підприємствах є перспективною можливістю для вітчизняних підприємств з урахуванням зростаючого глобального ринку пробіотиків нового покоління.

АНАЛІЗ ЗАСТОСУВАННЯ СУЧАСНИХ БІОМАТЕРІАЛІВ ДЛЯ ЗАГОСННЯ РАН

Матяш Н.М.

Науковий керівник: Хохленкова Н.В.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна
nataliamatyash13@gmail.com

Вступ. Процес загоєння ран є складним біологічним явищем, що охоплює чотири послідовні фази: гемостаз, запалення, проліферацію та ремоделювання. Хронічні виразки, діабетичні рани та опікові ураження становлять значну медичну проблему, оскільки стандартні методи лікування не завжди забезпечують оптимальні умови для регенерації тканин.

162.01.03.00.000 АСА

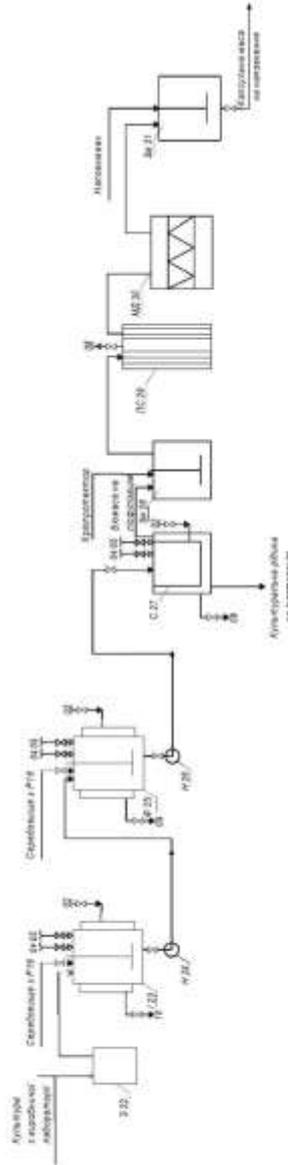


Таблиця умовних позначень

Умовне позначення	Назва елемента
01	Вода очищена
02	Вода зорєчана
03	Вода холодна
04	Азот
05	Бульбужний азот
06	Тара
07	Стерильне повітря
08	Вакуум
09	Вода оборотна
10	Каналізація
11	Вентиляція

Перелік елементів схеми

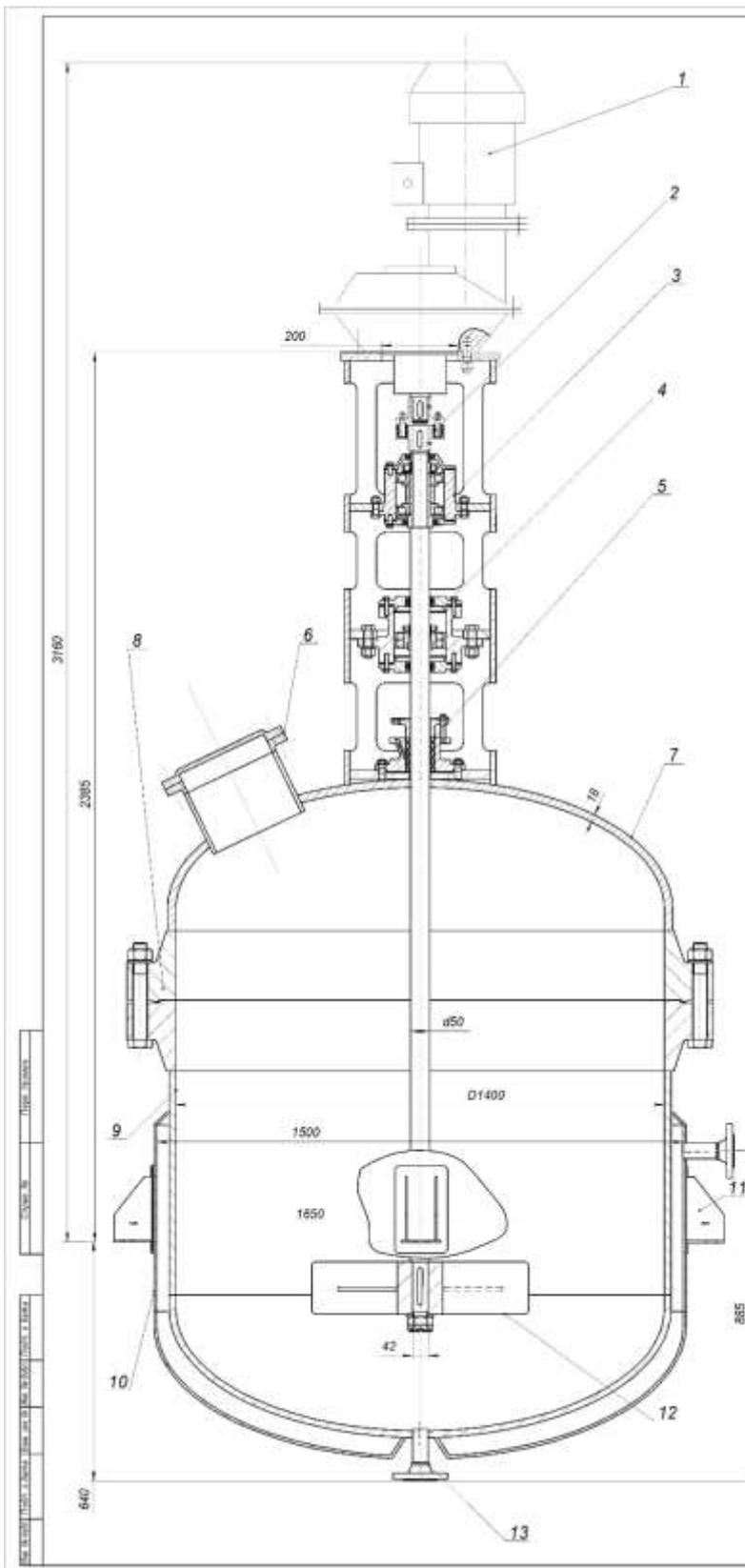
Позначення	Найменування	Кол.
З	Збірник	7
В	Ваза	2
М	Мішок	5
Р	Резервуар	3
Н	Насос	5
Ф	Фільтр	1
І	Інструментар	1
Ф	Ферментер	1
С	Сепаратор	1
ЛС	Лінійна сушарка	1
Зм	Змішувач	2
МД	Млин дисперсатор	1



162.01.03.00.000 АСА

№	Код	Назва	Кол.	Відомості
1	1	Деталь вироблена	1	1-1
2	2	Деталь вироблена	1	1-1
3	3	Деталь вироблена	1	1-1
4	4	Деталь вироблена	1	1-1
5	5	Деталь вироблена	1	1-1
6	6	Деталь вироблена	1	1-1
7	7	Деталь вироблена	1	1-1
8	8	Деталь вироблена	1	1-1
9	9	Деталь вироблена	1	1-1
10	10	Деталь вироблена	1	1-1
11	11	Деталь вироблена	1	1-1
12	12	Деталь вироблена	1	1-1
13	13	Деталь вироблена	1	1-1
14	14	Деталь вироблена	1	1-1
15	15	Деталь вироблена	1	1-1
16	16	Деталь вироблена	1	1-1
17	17	Деталь вироблена	1	1-1
18	18	Деталь вироблена	1	1-1
19	19	Деталь вироблена	1	1-1
20	20	Деталь вироблена	1	1-1
21	21	Деталь вироблена	1	1-1
22	22	Деталь вироблена	1	1-1
23	23	Деталь вироблена	1	1-1
24	24	Деталь вироблена	1	1-1
25	25	Деталь вироблена	1	1-1
26	26	Деталь вироблена	1	1-1
27	27	Деталь вироблена	1	1-1
28	28	Деталь вироблена	1	1-1
29	29	Деталь вироблена	1	1-1
30	30	Деталь вироблена	1	1-1
31	31	Деталь вироблена	1	1-1
32	32	Деталь вироблена	1	1-1
33	33	Деталь вироблена	1	1-1
34	34	Деталь вироблена	1	1-1
35	35	Деталь вироблена	1	1-1
36	36	Деталь вироблена	1	1-1
37	37	Деталь вироблена	1	1-1
38	38	Деталь вироблена	1	1-1
39	39	Деталь вироблена	1	1-1
40	40	Деталь вироблена	1	1-1
41	41	Деталь вироблена	1	1-1
42	42	Деталь вироблена	1	1-1
43	43	Деталь вироблена	1	1-1
44	44	Деталь вироблена	1	1-1
45	45	Деталь вироблена	1	1-1
46	46	Деталь вироблена	1	1-1
47	47	Деталь вироблена	1	1-1
48	48	Деталь вироблена	1	1-1
49	49	Деталь вироблена	1	1-1
50	50	Деталь вироблена	1	1-1
51	51	Деталь вироблена	1	1-1
52	52	Деталь вироблена	1	1-1
53	53	Деталь вироблена	1	1-1
54	54	Деталь вироблена	1	1-1
55	55	Деталь вироблена	1	1-1
56	56	Деталь вироблена	1	1-1
57	57	Деталь вироблена	1	1-1
58	58	Деталь вироблена	1	1-1
59	59	Деталь вироблена	1	1-1
60	60	Деталь вироблена	1	1-1
61	61	Деталь вироблена	1	1-1
62	62	Деталь вироблена	1	1-1
63	63	Деталь вироблена	1	1-1
64	64	Деталь вироблена	1	1-1
65	65	Деталь вироблена	1	1-1
66	66	Деталь вироблена	1	1-1
67	67	Деталь вироблена	1	1-1
68	68	Деталь вироблена	1	1-1
69	69	Деталь вироблена	1	1-1
70	70	Деталь вироблена	1	1-1
71	71	Деталь вироблена	1	1-1
72	72	Деталь вироблена	1	1-1
73	73	Деталь вироблена	1	1-1
74	74	Деталь вироблена	1	1-1
75	75	Деталь вироблена	1	1-1
76	76	Деталь вироблена	1	1-1
77	77	Деталь вироблена	1	1-1
78	78	Деталь вироблена	1	1-1
79	79	Деталь вироблена	1	1-1
80	80	Деталь вироблена	1	1-1
81	81	Деталь вироблена	1	1-1
82	82	Деталь вироблена	1	1-1
83	83	Деталь вироблена	1	1-1
84	84	Деталь вироблена	1	1-1
85	85	Деталь вироблена	1	1-1
86	86	Деталь вироблена	1	1-1
87	87	Деталь вироблена	1	1-1
88	88	Деталь вироблена	1	1-1
89	89	Деталь вироблена	1	1-1
90	90	Деталь вироблена	1	1-1
91	91	Деталь вироблена	1	1-1
92	92	Деталь вироблена	1	1-1
93	93	Деталь вироблена	1	1-1
94	94	Деталь вироблена	1	1-1
95	95	Деталь вироблена	1	1-1
96	96	Деталь вироблена	1	1-1
97	97	Деталь вироблена	1	1-1
98	98	Деталь вироблена	1	1-1
99	99	Деталь вироблена	1	1-1
100	100	Деталь вироблена	1	1-1

162.01.03.00 000 B3



Техническая характеристика
 Объем, м³ куб. 2,0
 Тиск в корпусі, МПа 2,4
 Тиск в корпусі, МПа 0,5
 Частота обертів шиб., об/хв 24-110
 Потужність на валу двигуна, кВт 2,8

Перелік основних частин апарату

Лаз.	Позначення	Найменування	Кіл.	Дименсія
1		Мотор	1	
2		Стійка приводу	1	
3		З'єднувальна муфта	1	
4		Опційний підшипник	1	
5		Радіальний підшипник	1	
6		Ліж	1	
7		Кришки корпусу	1	
8		Фланець	1	
9		Об'ємник корпусу	1	
10		Сорочка	1	
11		Опційні лопаті	1	
12		М'якоти	1	
13		Штирчик виходу	1	

162.01.03.00 000 B3			
Реактор			
Лист	Всього листів	Дата	1.10
ІНДЕКС		Картонів 57	