

Винахід відноситься до мікробіологічної і медичної промисловості, до галузі біотехнології, зокрема, до способів одержання імуномодуляторів із клітин мікроорганізмів і може бути використаний для виробництва медичних і ветеринарних препаратів.

Регуляція імунітету за допомогою біологічно активних речовин в останні роки займає важливе місце в дослідних роботах по цій проблемі. Кількість імуномодуючих засобів, які знаходяться в теперішній час на стадіях клінічного дослідження на Україні і в країнах СНД, достатньо велика, але в терапевтичну практику ввійшло всього декілька препаратів. Імуномодулятори, які використовуються в терапевтичній практиці, можуть бути продуктами синтетичного, тваринного, рослинного або мікробного походження. Найбільш перспективними для масового використання в медицині вважаються мікробні імуномодулятори у вигляді необмеженої доступності вихідної сировини і великих можливостей, які відкриваються відбором і штучним мутагенезом продуцентів для направленного біосинтезу.

Способи одержання імуномодуляторів із мікроорганізмів відомі давно. Компоненти клітинних стінок грамнегативних бактерій (ліпополісахариди) мають високу імуностимулюючу активність в здатності тормозити ріст пухлинних клітин. Але препарати із таких мікроорганізмів проявляють також високу токсичність, що стримує їх застосування в медицині.

Можливість зберегти активність і одночасно знизити токсичність цих препаратів вирішується складними багатостадійними способами виробництва з використанням токсичних хімічних реагентів, дороговартісного обладнання і складних методик очистки.

Вибір мікроорганізму, як джерела одержання біологічно активних речовин, особливості складу і будови клітин продуцента визначають технологію виробництва і фармакологічні властивості одержуваного препарату.

Відомі способи одержання водорозчинних пептидогліканів, які мають імуностимулюючу активність, із стрептококів, стрептоміцетів, стафілококів за допомогою специфічних ферментів, які лізують клітинні стінки. Виділяють і очищають пептидогліканові фракції за допомогою молекулярних сит і іонообмінних смол.

Також відомий спосіб одержання імуномодуючого препарату із біомаси клітин *Streptococcus pyogenes* (заявка Японії, №1-04017, фірма Chugai Hiaki KK). Суспензії клітин оброблюють антибіотиком, інкубують і додатково оброблюють протеолітичними ферментами. Там же розроблений спосіб одержання імуномодуючого препарату із клітин *Streptococcus equisimilis* зі зниженою здатністю проявляти негативні побічні ефекти. Дія дезоксирибонуклеази і рибонуклеази для розщеплення нуклеїнових кислот і протеази для гідролізу протеїнів покращує фізіологічні властивості препарату.

Наведені вище способи складні в одержанні препаратів в промислових умовах, так як вимагають застосування дороговартісних специфічних ферментів і багатостадійних схем очистки, в тому числі хроматографічні методи очистки.

Лактобацили давно привертають увагу дослідників сприятливим впливом на організм людини і тварин.

Протипухлинна дія речовин, які містяться в клітинних стінках штамів *Lactobacillus bulgaricus*, була відкрита І.Г. Богдановим (Пути и методы изыскания противоопухолевых антибиотиков, I, 1959, стр. 108). Показано, що фармакологічна дія визначається наявністю в лізатах глікопептидних фрагментів клітинних стінок, і встановлено їх будову (FEBS Letters V 57, №3, 1975, стр. 259-261).

Існують способи одержання імуномодуляторів з використанням різних штамів молочнокислих бактерій *Lactobacillus bulgaricus*.

Так, описаний спосіб одержання імуномодулятора із цього штаму, який включає ферментативний гідроліз трипсином, відокремлення клітинних стінок, обробку трихлороцтовою кислотою, гідроліз лізоцимом, відокремлення одержаного лізату і сублімаційну сушку цільового продукту ("Биотехнология", №1, 1986, стр. 101-109). Спосіб пропонує використання токсичної трихлороцтової кислоти, що не бажано для промислового виробництва.

Найбільш близьким до заявленого є спосіб одержання імуностимулятора пролонгованої дії із штаму *Lactobacillus bulgaricus* (а.с. СРСР №1630830, 1991 р.), який вибраний в якості прототипу. Спосіб пропонує обробку біомаси клітин (біодеградацію) альбуміном і пепсином або трипсином, відокремлення активної субстанції ультрафільтрацією і сублімаційною сушкою для одержання цільового продукту. В патенті описано декілька схем одержання біологічно активної речовини, але вони або потребують застосування токсичних речовин, або включають дуже багато стадій. Це робить проблематичним використання вказаного способу для промислового виробництва.

Задача, яку вирішують автори заявленого способу, полягає в розробці промислового способу одержання нетоксичного імуномодуючого препарату зі стабільними властивостями і складом, широким спектром фармакологічної дії при високій активності без використання в технології шкідливих речовин і складних схем очистки.

Вирішування задачі полягає в способі одержання природного імуномодулятора шляхом культивування бактерій *Lactobacillus bulgaricus* з подальшим виділенням цільового продукту, який відрізняється тим, що в якості культури-продуцента використовують штам *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702, депонований в колекції Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України (реєстраційний номер IMB B-7085), а одержану при культивуванні біомасу клітин піддають біодеградації - спочатку ступеневим лужним гідролізом з використанням концентрованого розчину натрію гідроксиду:

- при температурі (40-45)°C - 2 години;
- при температурі (50-55)°C - 1 година;
- при температурі (56-58)°C - 1-2 години, до гідролізу клітинних стінок і далі ферментативним гідролізом з використанням розчину лізоциму концентрацією (0,2-0,6)%.

Спільними з прототипом ознаками є:

- використання мікроорганізмів *Lactobacillus bulgaricus*;
- культивування на поживному середовищі, яке містить джерела вуглецю, азоту, фосфору, мінеральні солі і вітаміни в анаеробних умовах при температурі від 28 до 50°C;
- обробка клітин біодеградуючими агентами;

- виділення цільового продукту.

Відмінними ознаками є:

- використання нового штаму *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702;

- проведення біодеградації клітин ступеневим лужним гідролізом (при поступовому підвищенні температури гідролізу) з подальшим ферментативним гідролізом розчином лізоциму концентрацією 0,2-0,6%.

Для реалізації способу використовують новий штам *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702, виділений із асоціативної культури молочнокислих бактерій. Штам депонований в колекції Депозитарію Інституту мікробіології і вірусології НАН України як *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 1MB B-7085.

Дата депонування 18.12.2002 р.

Штам характеризується наступними властивостями:

Морфологія клітин

Грампозитивні, нерухомі, рівні палички 0,5х3-8мкм з заокругленими кінцями, розташовуються ланцюжками різної довжини.

Фізіологічна характеристика штаму.

Факультативний анаероб, оптимальна температура (40±1)°C. Оптимум pH 6,0-6,2. Каталазонегативний, нітрати і нітроти не відновлює, желатину не розріджує, аміак із аргініну не утворює. Молоко згущує, утворюючи кислоту (1,3%), молоко з лакмусом відновлює без утворення газу, відновлює молоко з метиленовою синькою, на середовищах з підвищеним вмістом (більше 4%) хлористого натрію і pH більше 9,6 не росте. Не виживає після прогрівання при температурі 63°C протягом 30 хвилин, слиз не утворює, росте на середовищах з жовцю (40%).

Зброджує: глюкозу, фруктозу, лактозу, сахарозу.

Не зброджує: арабінозу, мальтозу, дульцит, ксилозу, рафінозу, інозит, рибозу, манніт, інουλін, целобіозу, галактозу, ескулін, сорбозу, амігдалін, трегалозу, маннозу.

Штам відноситься до групи *delbrueckii* роду *Lactobacillus*, ріст можливий від 28 до 50°C і pH від 3,5 до 8,5, оптимальна температура від 36 до 40°C, pH від 5,6 до 6,4.

Культурально-морфологічні особливості штаму

Штам росте на середовищах, селективних для молочнокислих бактерій. На поверхні агаризованих середовищ утворює напівпрозорі, білуваті колонії, гладенькі з блиском, слабовипуклі, круглі з нерівним краєм діаметром 1-3мм. В товщі агару - білуваті дисковидні колонії діаметром 1-2мм. В рідкому середовищі утворює однорідну муть і дрібнодисперсний осад.

Спосіб, умови і склад середовищ для зберігання:

На рідкому середовищі MRS з вмістом 0,5% глюкози і 2% крейди протягом 2-х місяців при температурі 4°C.

Тривале зберігання в ліофілізованому стані при температурі (4-8)°C.

Захисні середовища при висушуванні: сахароза - 10%, желатин - 1%, pH - 7,0±0,2 або сахароза - 10%, поліглюкін - 2%.

Спосіб, умови і склад середовищ для розмноження штаму:

Температура росту (39±1)°C, час 18-24 години, pH - 6,6-6,8. Середовище MRS; середовище P-4 складу, г/л:

Рибний гідролізат - 10,0;

Дріжджовий екстракт - 10,0;

Цукор - 10,0;

Магній сірчаноокислий 7-водний - 0,2;

Марганець сірчаноокислий 5-водний - 0,005;

Натрій лимоннокислий - 5,0.

Умови і склад середовищ для ферментації:

Температура росту (39±1)°C, pH - 6,6-6,8.

Середовище B-1 з вмістом амінного азоту складу, %:

Ферментолізат казеїну - 50% по амінному азоту;

Ферментолізат соєвого борошна - 23% по амінному азоту;

Дріжджовий екстракт - 17% по амінному азоту;

Кукурудзяний екстракт - 10% по амінному азоту;

Цукор - 0,5-1,5;

Магній сірчаноокислий 7-водний - 0,2;

Марганець сірчаноокислий 5-водний - 0,005;

Калій фосфорнокислий двоаміщений - 2,0;

Вода дистильована - до 1 літра.

Активність культури: накопичення біомаси 1·10⁸кл/мл. Титр визначають методом граничних розведень в стовпчиках агаризованого середовища MRS.

Вирішення поставленої задачі обумовлене сукупністю властивостей нового штаму-продуцента і запропонованим способом лізису біомаси клітин ферментами лізоцимом і трипсином в названій послідовності і певній концентрації. Саме ця сукупність ознак забезпечує одержання біологічно активної речовини з широким спектром фармакологічної дії.

Культивування штаму здійснюють в анаеробних умовах при температурі (39±1)°C на збалансованому поживному середовищі, %:

Калій фосфорнокислий

одноаміщений - 0,18-0,22

Магній сірчаноокислий 7-водний - 0,01-0,03

Марганець сірчаноокислий 5-водний - 0,005-0,007

Цукор-пісок - 0,5-1,5

Ферментолізат казеїну - 1,8-2,2

Ферментолізат борошна соєвого	- 0,8-1,2
Екстракт дріжджовий	- 1,8-2,4
Екстракт кукурудзяний	- 0,3-0,6

По закінченню культивування проводять відокремлення біомаси клітин сепарацією.

Одержану біомасу суспендують у воді. До суспензії клітин доливають 20% розчин натрію гідроокису при вихідному нейтральному значенні рН (7,0±1,0). Лужний гідроліз проводять ступенево: спочатку протягом двох годин при температурі (40-45)°С, потім протягом 1 години при температурі (50-55)°С і далі одну, дві години при (56-58)°С до гідролізу клітинних стінок. Після охолодження суспензії до температури (20±1)°С проводять нейтралізацію клітинного матеріалу 14%-ним розчином соляної кислоти до рН (6,0±0,1) при перемішуванні. Після промивки та відокремлення клітинного матеріалу додають хлороформ для виключення мікробного забруднення і проводять його ферментативний гідроліз. Ферментативний гідроліз проводять при рН (7,0±0,1), який доводять 14%-ним розчином соляної кислоти, і температурі (38±1)°С. В суспензію гідролізату клітинного матеріалу додають 1%-ний розчин лізоциму в кількості 0,2-0,6% до вихідної суспензії. Гідроліз проводять на протязі 2-10 годин при перемішуванні і рН (7,0±0,1). Закінчення процесу лізису визначають по зміні оптичної густини суспензії. Через 2-3хв після внесення розчину лізоциму відбирають пробу суспензії і вимірюють оптичну густину суспензії ($D_{вих}$) на спектрофотометрі при довжині хвилі 450нм і товщині поглинання шару 1см. Суспензію розводять водою в 100-200 разів. Проби для визначення рН і оптичної густини (D) відбирають через кожну годину процесу. Ступінь гідролізу (K) розраховують за формулою:

$$K = \frac{D_{вих} - D_{кін}}{D_{вих}}$$

при $K=0,50-0,60$ процес лізису закінчують, температуру суспензії знижують до (20±2)°С. Далі за допомогою центрифугування відділяють тверду фазу (клітинний осад).

В одержаному супернатанті проводять кислотну денатурацію білків при рН (3,0±0,1) центрифугуванням з числом обертів 5000хв⁻¹. Одержаний фугат нейтралізують концентрованим розчином натрію гідроокису, у разі випадання осаду повторно центрифугують для відокремлення білка.

Виділення препарату проводять шляхом спиртоосадження, для чого до нейтралізованого лізату (фугату) додають 5-ти кратний об'єм 96% спирту етилового. Відділяють осад, промивають спиртом і розчиняють в очищеній воді.

Одержаний розчин висушують на сублімаційній сушарці.

Операції розділення фаз і концентрування можна проводити і іншими відомими способами.

Одержаний препарат являє собою порошок кремового кольору, помірно розчинний у воді, масова частка води не більше 5%. Має стабільний склад: глюкозамін не менше 15%, пептиди не менше 30%, нуклеїнові кислоти не більше 1% і біологічну активність по підсиленню фагоцитоза *in vivo* не менше 25%.

Саме такий біохімічний склад забезпечує спектр фармакологічної дії, одержаної в результаті реалізації описаних нижче властивостей препарату, що підтверджується даними експериментів. За даними інституту проблем онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького (ІПОР) НАН України, препарат, одержаний по вище описаній технології, малотоксичний, має імунотимізуючі властивості (малі дози стимулюють клітинний і особливо гуморальний імунітет, великі дози можуть його пригнічувати), а також явну протипроменеву дію.

Препарат проявляє протипухлинний і антиметастичний вплив. Покращує мікроциркуляцію, стимулює ендотеліальну систему, сприяє прискоренню регенеративних процесів. Препарат вводили внутрішньочеревно, підшкірно і перорально в широкому діапазоні концентрацій (від 1/10 до 1/75000 від ЛД₅₀) при ЛД₅₀ ≈ 7000мг/кг. Як стимулятор антитілогенезу у мишей високореагуючої лінії СВА має здатність активувати синтез антитіл, не порушуючи механізмів регуляції зворотньої реакції організму на гетерогени, а по силі імуностимулюючого ефекту не поступається загальнопризаному комерційному препарату - повному ад'юванту Фрейнда.

В великих дозах (1/10 і 1/100 від ЛД₅₀) має протипухлинний і антиметастичний ефект, але не пригнічує росту лейкозних клітин. При комбінованому лікуванні на 20-30% підсилюється протипухлинна дія циклостатинів (циклофосфан і ін.). При підшкірних способах введення ефективність препарату збільшується порівняно з внутрішньом'язовим і уже введення дози 1/1000-1/75000 від ≈ ЛД₅₀ дозволяє одержувати відчутні імуностимулюючі ефекти. Субстанція ефективна як в опроміненному, так і в інтактному організмі. По впливу на клітинну імунну відповідь пероральне застосування препарату не поступається парентеральному.

Субстанція із Лактобацили (Бластолена), одержана по вищеописаній технології з використанням нового штаму *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702, підвищувала мікроциркуляцію, стимулювала ендотеліальну систему, сприяла регенеративним процесам.

В експериментах на тваринах використовували як субстанцію Бластолена, так і його лікарські форми (ін'єкційний препарат і таблетки). Виявлені при дослідженні субстанції закономірності підтвердилися і при використанні готової лікарської форми препарату.

При розробці ефективних доз і схем введення був вибраний оптимальний варіант, що дозволило підготувати інструкцію по клінічному вивченню Бластолена. Одночасно з врахуванням ефективних доз і схеми введення проведений комплекс досліджень з хронічної токсичності і показана нешкідливість субстанції і її лікарських форм (ін'єкційної і пігулкової в об'ємі вимог ФК України) Українським науково-дослідним інститутом фармакології і токсикології (УНДІФТ).

Промислове застосування способу показано в прикладах конкретного виконання:

Приклад 1. Вирощування культури *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702 здійснювали в дослідно-промислових умовах в ферментаторі ємністю 10м³ з інокулятором ємністю 1,2м³ на середовищі слідуєчого складу, %:

Калій фосфорнокислий	
однозаміщений	- 0,22
Магній сірчанокислий 7-водний	- 0,022
Марганець сірчанокислий 5-водний	- 0,0055

Цукор-пісок	- 1,0
Ферментолізат казеїну	-1,8
Ферментолізат борошна соєвого	- 1,0
Екстракт дріжджовий	-2,0
Екстракт кукурудзяний	- 0,6

Ферментолізати і екстракт дріжджовий використовували готові, в сухому вигляді, для економії часу, енерговитрат і з метою одержання стабільних результатів. Змішували всі компоненти поживного середовища, стерилізували в ферментаторі при температурі (126-128)°C 40хв. Після охолодження середовища до 40°C проводили засів інокулятора однодобовою посівною культурою, вирощеною на середовищі MRS (8-10л).

Культивування проводять в анаеробних умовах при температурі (39±1)°C. Корегування pH в процесі росту культури не проводять.

Через 6-10 годин інокулят в асептичних умовах пересівають в підготовлене поживне середовище в ферментатор (5,0м³ поживного середовища). Ріст культури супроводжується закисанням поживного середовища до pH 3,8-4,2, накопичення біомаси контролюють під мікроскопом і шляхом вимірювання оптичної густини культуральної рідини. Через 14-16 годин при стабілізації росту культури процес культивування припиняють шляхом охолодження культуральної рідини оборотною водою до температури (15-18)°C. Потім проводять сепарування біомаси на сепараторі Westfalia (швидкість подачі 250-300л/год). Після закінчення сепарації біомасу клітин (25кг) за допомогою спеціального пристрою виймають із сепаратора і порціями направляють на стадію лужного гідролізу або на сублімаційну сушарку (при зберіганні).

Беруть 2кг промитої вологої біомаси (W=75%) або 500г сухої сублімованої, додають 3л очищеної води в бутель (або 500г сублімованої біомаси і 5л очищеної води). Суспензію перемішують 30-40хв. до гомогенного стану мішалкою, додають в суспензію при перемішуванні розчин натрію гідроокису (20%) до встановлення значення pH 7,0. Потім в реактор додають 4л очищеної води і доводять об'єм в реакторі до 9,0л. Нагрівають суміш в реакторі до температури 45°C, додають 1л 20%-ного розчину натрію гідроокису. Гідроліз проводять протягом 2 годин при температурі суспензії (40-45)°C, далі нагрівають до температури 55°C і витримують 1 годину, нагрівають до 58°C і витримують 2 години. По закінченню процесу гідролізу суспензію охолоджують до 20°C оборотною водою і центрифугують при 12000хв⁻¹. Супернатант передають на знешкодження. Проводять розборку центрифуги, осад передають в бутель, промивають водою і нейтралізують 14%-ним розчином соляної кислоти до pH (6,0±0,1). Після центрифугування і промивки клітинного матеріалу його суспендують в 5л очищеної води і доводять pH до значення (7,0±1,0). Для виключення бактеріального забруднення в реактор доливають 15-20мл хлороформа. Після прогріву суспензії клітинного матеріалу до (38±1)°C в реактор через загрузочний люк додають 150мл розчину лізоциму з масовою часткою 1% (або 0,3% в перерахунку на вихідну суху біомасу). Процес лізису проводять при постійному перемішуванні на протязі 10 годин, контролюючи pH і температуру. Закінчення процесу лізису визначають по зміні оптичної густини ($\lambda = 450\text{nm}$). При ступеню гідролізу (K) рівному 0,55 - лізис клітин проведений повністю. По закінченню процесу лізису суспензію центрифугують при 20000хв⁻¹.

Супернатант збирають в бутель і передають на стадію концентрування. Концентрують лізат при температурі 40°C під вакуумом за допомогою роторного випарювача до 2л (ступінь концентрування - 5 разів).

Далі проводять кислотну денатурацію білків. При перемішуванні додають 14% розчин соляної кислоти до значення pH розчину 3,0. Закислений концентрат лізату центрифугують при 10000хв⁻¹. Прозорий супернатант збирають в бутель і нейтралізують до pH (7,0±0,1) 20%-ним розчином натрію гідроокису.

До 2л очищеного концентрату лізату додають 10л спирту етилового (співвідношення об'ємів концентрату і спирту 1:5). Спиртову суміш витримують при кімнатній температурі 12 годин до утворення на дні бутелю щільного липкого осаду.

Потім спиртовий розчин, який знаходиться над осадом, зливають, а осад промивають 1,0л етилового спирту. Після промивки розчиняють осад в 2,0л очищеної води. Розчин субстанції розливають в металеві піддони товщиною шару 1см розчину в кожний піддон, заморожують протягом 6 годин при температурі мінус 35°C. Сублімаційну сушку проводять на сублімаційній сушарці ТГ-50 на протязі 38 годин. Висушену субстанцію препарату розфасовують по 10г в подвійні пакети із поліетиленової плівки з запаюванням пакетів. Вихід субстанції склав 25г або 5% від кількості вихідної біомаси.

Таким чином, вихід біологічно активної речовини (БАР) склав в одному технологічному циклі 25г БАР або 7500 ін'єкційних доз готової лікарської форми препарату. В перерахунку на одну дослідно-промислову (5,0м³ поживного середовища) ферментацію, вихід БАР склав 180г, що дозволить виготовити 54000 лікарських доз препарату, що має імуномодуючу, протипухлинну і регенеративну дію.

Субстанція - порошок кремового кольору, помірно розчинний у воді; масова частка води 4,8%, вміст пептидів 31%, глюкозаміну 17%, нуклеїнових кислот 0,05%; біологічна активність по підсиленню фагоцитозу 30%. Субстанція зберігає біологічну активність на протязі 2 років.

Приклад 2. Біомасу клітин штаму *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702 одержували так, як в прикладі 1.

125,0г сухої промитої біомаси суспендують в 1400мл очищеної води. Потім добавляють 200мл 20%-ого розчину натрію гідроокису і проводять лужний гідроліз по схемі, описаній в прикладі 1.

Після цього проводять нейтралізацію гідролізату 14%-ним розчином соляної кислоти до pH 6,0 і центрифугують суспензію при 17000хв⁻¹ на протязі 40хв. Супернатант в об'ємі 1100мл передають на знешкодження, 110г осаду суспендують в 1400мл очищеної води. Після промивки осад суспендують в 1л очищеної води, потім добавляють 75мл (0,6% до маси вихідної біомаси) 1% розчин лізоциму і при pH 7,0, температурі 38°C проводять ферментативний гідроліз клітинних стінок протягом 2 годин до оптичної густини (K), 0,6. Потім процес лізису припиняють, відділяють лізат за допомогою центрифугування. Доводять pH супернатанту до 3,0 14% розчином соляної кислоти і відділяють білки, що випали в осад, центрифугуванням. Потім прозорий супернатант нейтралізують додаванням 20% розчину натрію гідроокису до pH 7,0. Далі прозорий розчин нейтралізованого лізату піддають спиртоосадженню (аналогічно способу, описаному в прикладі 1), осад розчиняють в 500мл очищеної води і передають на сублімаційну сушарку. Одержано 6,5г субстанції, що склала 5,2% від вихідної біомаси.

Показники препарату: Порошок кремового кольору, помірно розчинний у воді, масова доля води - 4,3%, вміст пептидів - 33%, кількість нуклеїнових кислот - 0,3%, вміст глюкозаміну - 10%, біологічна активність по підсиленню фагоцитозу - 40%.

Приклад 3. Біомасу штаму *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702 одержували способом, описаним в прикладі 1. Весь хід технологічного процесу майже до лізису лізоцимом також був аналогічним, крім того, що використовували не 150мл 1% розчину лізоциму, а 50мл, тобто 0,1% до вихідної біомаси. Через 10 годин К склав тільки 0,2, збільшення часу лізису до 15-20 годин також не привело до досягнення позитивного результату, лізис клітинних стінок практично не йшов ($K=0,25$).

Приклад 4. Біомасу штаму *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702 одержували способом, описаним в прикладі 1. Весь хід технологічного процесу одержання біологічно активної субстанції був аналогічним прикладу 2. На стадії лізису взяли 1г лізоциму (0,8% до вихідної біомаси). Процес лізису клітинних стінок пройшов практично за одну годину, $K=0,75$. Після сушки субстанції було одержано 7г препарату.

По всім своїм якісним показникам препарат відповідав вимогам НТД, тільки по вмісту нуклеїнових кислот (їх було 1,8%) препарат був некондиційним.

Таким чином, при використанні для стадії лізису лізоциму концентрацією 0,2-0,6% до маси вихідної біомаси вдається одержати продукт з регламентним виходом і якістю, які відповідають вимогам розробленої НТД.