

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ
Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Освітньо-професійна програма « Біотехнології: фармацевтична
промислова, харчова, природоохоронна»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 04 ” квітня 2022 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

НАГОРНОЇ Тетяни Сергіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Bacillus subtilis* для одержання
пробіотичного препарату

керівник роботи СТАРОВОЙТОВА Світлана Олександрівна, к.б.н. доц.
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Bacillus subtilis*; цільовий продукт:
пробіотик; середовище культивування: напів-синтетичне середовище з
мелясою; інокулятор та ферментер для промислового культивування: об'ємами
0,06 та 0,36 відповідно; параметри культивування: T=37°C, τ=36 год, аерація
O₂=0,7 дм³.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування
вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне
обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ
5 Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу
біомаси *Bacillus subtilis* 1.1 для отримання пробіотичного препарату. РОДІЛ 7.
Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна схема виробництва – 1 аркуш
формату А1. Апаратурна схема виробництва – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	04.04.2022 - 10.04.2022	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	11.04.2022- 20.04.2022	
3	Техніко – економічне обґрунтування	21.04.2022- 27.04.2022	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	28.04.2022- 04.05.2022	
5	Специфікація обладнання	05.05.2022- 11.05.2022	
6	Опис технологічної схеми біосинтезу біомаси <i>bacillus subtilis</i> 1.1 для отримання пробіотичного препарату	12.05.2022- 17.05.2022	
7	Контроль виробництва	18.05.2022- 23.05.2022	
8	Оформлення пояснювальної записки	24.05.2022- 27.05.2022	
9	Виконання графічної частини проекту	28.05.2022- 01.06.2022	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Тетяна НАГОРНА _____
(ім'я та прізвище)

Світлана СТАРОВОЙТОВА _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт присвячений вибору біологічного агента для отримання пробіотичного препарату на основі біомаси бактерій *Bacillus subtilis*. А також розробленню технологічної схеми біосинтезу для його виробництва.

Згідно розглянутій літературі штам *Bacillus subtilis* 1.1 є одним з найкращих і найвигідніших для виготовлення пробіотичного препарату. Препарат на основі даного продуцента здатний пригнічувати патогенну та умовно патогенну флору, сприяти росту нормальної мікрофлори та підвищувати загальну опірність організму до інфекцій. А також має змогу продукувати інтерферон альфа-2, який є ідентичним власному лейкоцитарному інтерферону людини [1].

Технологічна схема біосинтезу пробіотичного препарату включає допоміжні роботи (підготовка розчину кислоти для підкислення поживного середовища під час стерилізації, та підготовка розчину лугу для нормалізації рН) та технологічний процес (до якого входять: вирощування бактерій в колбах на качалці 5 шт, вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 0,06 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 та біосинтез у ферментері об'ємом 0,63 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6). Технологія отримання пробіотика передбачає використання одностадійної схеми культивування глибинним періодичним способом, з подачею аераційного повітря.

Дипломний проєкт складається зі вступу, семи розділів, списку використаних джерел, технологічної схеми (формат А3) та апаратурної схеми (формат А3). Загальний обсяг роботи – 74 сторінок, 5 рисунків, 13 таблиць.

Ключові слова: *Bacillus subtilis*, біомаса, пробіотики, біологічний агент, пробіотичні штами, травні ферменти, ферментативна активність, оптимізація рН, кишечник, хвороби органів травлення, виробниче культивування, біосинтез.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	4
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	9
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	14
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	14
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	21
Фізіолого-біохімічні ознаки	22
2.3. Таксономічний статус біологічного агента	23
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО – ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	24
3.1. Потреба у біомасі <i>Bacillus subtilis</i>	24
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	29
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	29
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу біомаси <i>Bacillus subtilis</i> 1.1.	31
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	34
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	34
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	34
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	35
4.1.3. Обґрунтування стадії вибору мийних та дезінфікувальних засобів	36
4.1.3.1. Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій.....	40
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	42
4.1.4.1. Вирощування інокуляту в колбах на качалках	42
4.1.4.2. Вирощування інокуляту в посівних апаратах об'ємом 60 л	43
4.1.4.3. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 630 л	43
4.1.5. Обґрунтування використання титруючих агентів та піногасника	44
4.1.5.1. Використання титруючих агентів	44

4.1.5.2. Використання піногасника	46
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	47
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ БІОМАСИ <i>BACILLUS SUBTILIS 1.1</i> ДЛЯ ОТРИМАННЯ ПРОБІОТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ	52
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	64
7.1. Мікробіологічний контроль.....	64
7.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища.....	64
7.1.2. Мікробіологічний контроль посівного матеріалу	65
7.2. Методика визначення показників росту і синтезу цільового продукту	67
7.2.1. Визначення концентрації біомаси	67
7.2.2. Визначення кількості життєздатних клітин	67
7.2.3. Визначення кількості спор.....	68
7.2.4 Визначення пробіотичних властивостей.....	68
7.2.5. Визначення концентрації джерела Карбону	69
7.2.6. Визначення концентрації джерела Нітрогену	71
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	72

ВСТУП

Життя сучасної людини сповнене подіями, деякі з них впливають на стан здоров'я. Так, важливо знати про те, що людина та середовище, що її оточує, складають загалом єдину систему, що знаходиться у стані рівноваги до існуючих мікро- та макроорганізмів. Мікрофлора, що є у кишечнику, грає головну роль у багатьох процесах метаболізму, а в цілому впливає на життя людини, на її спроможність якісно працювати, бути активною [2].

Мікрофлора кишечника певним чином забезпечує його здоров'я та нормальне функціонування, тоді як суттєві зміни кількісного та якісного складу бактерій можуть бути асоційовані з багатьма хворобами. Досить багато пацієнтів приймають пробіотичні продукти у надії вплинути на стан мікрофлори та отримати зиск для власного здоров'я [3].

Нині застосовують різноманітні комбінації штамів, які позитивно впливають на здоров'я людини. Однією з найперспективніших груп пробіотиків є *Bacillus*, які володіють високою антагоністичною активністю проти представників патогенної та умовно-патогенної флори. У природі дуже поширеними є бактерії виду *Bacillus subtilis*, із якими людина постійно контактує через воду, повітря, харчові продукти. Тому ці мікроорганізми постійно потрапляють в організм і беруть участь у регуляції складу мікрофлори кишечника. Бактерії *Bacillus subtilis* є стійкими до літичних і травних ферментів та зберігають свою життєздатність вздовж усього ШКТ [4].

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.7 КР ПЗ</i>		
<i>Зми. Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Нагорна Т.С.</i>			<i>ВСТУП</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Старовойтова С.О.</i>					<i>7</i>	<i>77</i>
<i>Н. контр.</i>					<i>Кафедра БТМ</i> ⁷		
<i>Консульт.</i>							
<i>Затверд.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>						

Bacillus subtilis продукують деякі пептидні антибіотики, ферменти (протеази, амілазу), інтерферони, проявляють високу антагоністичну активність проти патогенних та умовно-патогенних бактерій (*Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*) за рахунок синтезу близько 70 речовин із протимікробною активністю, які не впливають на власну мікрофлору кишечника. Унікальною властивістю *Bacillus subtilis* є продукція дипіколінової кислоти: з одного боку, ця речовина є додатковим фактором ерадикації патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, з іншого – сприяє росту нормальної мікрофлори кишечника. *Bacillus subtilis* виділяють у просвіт кишечника субтилізин і ферменти, які сприяють руйнуванню та виведенню ендотоксинів патогенної та умовно-патогенної флори [4].

Таким чином, новизною даної роботи є використання штаму *B. subtilis* 1.1, що відповідає вимогам, які висуваються до пробіотичних штамів. Перевагою штаму *Bacillus subtilis* 1.1 є те, що він росте на більш дешевому поживному середовищі, та дає більший вихід біомаси ($3,6 \pm 0,2 \times 10^{10}$), в порівнянні з розглянутими штамми. Також досліджуваний штам – проявляє антагоністичну активність до різних умовно патогенних мікроорганізмів та стійкий до агресивних умов ШКТ. Особливістю є те, що він здатен синтезувати пігменти каротиноїдної природи, які мають провітамінну активність [9].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Доповнення людського мікробіому пробіотичними мікроорганізмами є запропонованим рішенням для цивілізаційних синдромів, таких як дисбіоз та розлади шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Пробиотичні штами роду *Bacillus* складають мікробіоти людського середовища і зазвичай містяться в ґрунті, воді, ряді немолочних ферментованих продуктів, а також у ШКТ людини та тварин [10].

Бактерії *B.subtilis* є одним з найбільш перспективних пробіотиків, що вивчалися за останні десятиліття. Механізми їхньої пробіотичної дії пов'язані з синтезом антимікробних засобів, підвищенням неспецифічного та специфічного імунітету, стимуляцією росту нормальної мікрофлори кишечника та виділенням травних ферментів. *B.subtilis* вивільняє рибосомно синтезовані пептиди, нерибосомно синтезовані пептиди та непептидні речовини з широким спектром антимікробної активності, що охоплює грампозитивні, грамнегативні бактерії, віруси та гриби. Стійкість до цих протимікробних засобів рідкісна. Підвищення неспецифічного імунітету пов'язане з активацією макрофагів і вивільненням із них запальних цитокінів, підвищенням бар'єрної функції слизової оболонки кишечника, вивільнення вітамінів та амінокислот (включаючи незамінні). Підвищення специфічного імунітету проявляється активацією Т- і В-лімфоцитів та вивільненням з них імуноглобулінів - IgG та IgA. *B.subtilis* стимулює ріст нормальної кишкової флори, зокрема, бактерій роду *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*. Даний пробіотик виділяє в просвіт кишечника всі основні травні ферменти: амілази, ліпази, протеази, пектинази та целюлази. На додаток до травлення, ці ферменти руйнують фактори, що не містять їжу, та алергенні речовини, що містяться в їжі [11].

					НУХТ БТЕК 04.01.7 КР ПЗ						
Зми. Арк.	№ докum.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту			Літ.	Арк.	Аркушів		
Розроб.	Нагорна Т.С.								9	77	
Керівник	Старовойтова С.О.						9				
Н. контр.							Кафедра БТМ				
Консульт.											
Затверд.	Стадніков В.П.										

Ці механізми дії обґрунтовують використання *B.subtilis* у комбінованій терапії для лікування кишкових інфекцій; профілактиці респіраторних інфекцій в холодну пору року; профілактиці діареї, пов'язаної з антибіотиками; для корекції порушень травлення різного походження (помилки в харчуванні, зміни раціону, захворювання шлунково-кишкового тракту, розлади вегетативної нервової системи тощо). Пробиотичні препарати на основі *B.subtilis* зазвичай не викликають побічних ефектів, та характеризуються високою ефективністю та співвідношенням безпеки [11].

Більшість бактерій роду *Bacillus* (включаючи *B.subtilis*) не є небезпечними для людини і широко поширені в навколишньому середовищі. Їх виявляють у ґрунті, воді, повітрі та харчових продуктах (пшениця, інші зернові культури, хлібобулочні вироби, соєві продукти, незбиране м'ясо, сире і пастеризоване молоко). Як наслідок, вони постійно потрапляють в ШКТ і дихальні шляхи. Кількість бацил в кишечнику може досягати 10^7 КУО/г, що порівнянно з аналогічним показником у *Lactobacillus*. У зв'язку з цим ряд дослідників розглядають бактерії роду *Bacillus* як один з домінуючих компонентів нормальної мікрофлори кишечника.

У той же час лікувальне введення *B.subtilis* дозволяє використовувати даний мікроорганізм як пробіотик, за чотирма основними напрямками: 1) для захисту від кишкових патогенів; 2) від дихальних патогенів; 3) для усунення дисбактеріозу при антибіотикотерапії; 4) для посилення травлення і просування їжі [12].

Пробиотики на основі *B.subtilis* зазвичай приймають перорально у вигляді спор, або живих бактерій (вегетативних клітин). Виживання спор в ШКТ не викликає сумнівів в зв'язку з їх високою стійкістю до дії різних фізико-хімічних факторів, зокрема екстремальних значень рН. У той же час дискутується питання про те, чи здатні живі бактерії проникати далі шлунка і виконувати пробіотичну функцію.

У багатьох роботах в яких вивчаються бактерії роду *Bacillus* було продемонстровано, що після перорального прийому спор спостерігається їх

проростання в ШКТ у вигляді вегетативних клітин. Потім спостерігається повторне перетворення в спори (респоруляція). Ці цикли повторюються кілька разів. В кінцевому рахунку спори з фекальними масами виявляються в зовнішньому середовищі. Аналогічно після перорального прийому вегетативних клітин спостерігається їх споруляції в ШКТ. Цикли проростання і респоруляції повторюються кілька разів до виведення з організму господаря [12].

Таким чином, у якому б вигляді не приймалися пробіотики на основі *B. subtilis* - в організмі реципієнта будуть присутні обидві форми бактерії, і терапевтична дія у них також буде однакова [12].

Згідно міжнародної системи класифікації лікарських засобів АТС, головним призначенням якої є наведення статистичних даних про споживання лікарських засобів, пробіотики відносяться до медичних імунобіологічних препаратів. Пробіотики на основі *B. subtilis* мають код АТС – А07FA 10 [13].

Параметри контролю готового препарату.

Контроль готового препарату передбачає опис, розчинність, прозорість та мікробіологічну чистоту, а також автентичність, кольоровість, значення рН, втрата в маси під час сушіння, специфічна нешкідливість, специфічна активність [13, 14].

Таблиця 1.1.

Параметри контролю

Найменування параметру	Встановлені значення	Методи контролю
Автентичність	Рухливі, грампозитивні спороутворюючі бактерії, довжиною 2 – 3 мкм, товщиною 0,4 мкм. Спори овальної форми, розміщені в центрі клітини, на всій поверхні мають джгутики. Строгий аероб. На	За п. 7.1.2 Контроль виробництва

	<p>поверхні рідких поживних середовищ утворюється тонка білувата плівка, а на поверхні агаризованих поживних середовищ утворюються круглі, сіруваті, гладенькі, блискучі колонії.</p>	
<p>Специфічна активність</p> <p>1. Кількість життєздатних клітин</p> <p>2. Протівірусна активність</p> <p>3. Антагоністична активність</p>	<p>Специфічна активність препарату визначається за кількістю життєздатних клітин <i>B.subtilis</i> в одній дозі препарату та антагоністичною активністю. В одній дозі препарату має міститися не менш як 10^9 життєздатних клітин.</p> <p>Протівірусну активність препарату визначають за інгібуванням цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) на культурі клітин диплоїдних фібробластів мишей Л-929.</p> <p>Для визначення кількості життєздатних клітин у культуральній рідині можна</p>	<p>За п. 7.2.2 Контроль виробництва</p>

	<p>використати метод Коха. Суть методу полягає у висіві певного об'єму досліджуваної суспензії на агаризоване середовище у чашки Петрі, з наступним підрахунком кількості колоній, що вирости.</p> <p>Для визначення антагоністичної активності пробіотичних мікроорганізмів використовують метод перпендикулярних штрихів.</p>	<p>За п. 7.2.4 Контроль виробництва</p>
--	--	---

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Для одержання високоефективного бактеріотерапевтичного препарату необхідно вирішити ряд важливих завдань, наприклад, підбір високоефективного пробіотичного штаму із визначеними терапевтичними властивостями та умов культивування, особливо оптимального складу поживного середовища, яке б задовольняло вимогам росту пробіотичних штамів [15].

Унікальний механізм дії бактерії *Bacillus subtilis* пов'язано з унікальною здатністю самостійно виробляти антибіотикоподібні речовини та ферменти, посилювати захисні сили організму в боротьбі зі звичайними та специфічними збудниками, стимулювати нормальний ріст мікрофлори кишківника. Вироблені *Bacillus subtilis* речовини активно пригнічують ріст та розвиток шкідливих бактерій, вірусів та грибів, не викликаючи звикання. Імуномоделююча дія пов'язана з активацією макрофагів, посиленням бар'єрної функції кишківника, активацією Т та В лімфоцитів. Знищуючи шкідливі мікроорганізми, звільнюють місце для розселення лакто- та біфідобактерій, які є типовими представниками нормальної мікрофлори [16].

					НУХТ БТЕК 04.01.7 КР ПЗ			
Зми.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата				
Розроб.	Нагорна Т.С.				РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Аркушів
Керівник	Старовойтова С.О.						14	77
Н. контр.						14		
Консульт.						Кафедра БТМ		
Затверд.	Стадников В.П.							

Особливості одержання біомаси різними штамми *Bacillus subtilis*

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація, КУО/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
<i>Bacillus subtilis</i> 3	зелена патока – 80 мл кукурудзяний екстракт – 60 мл MnSO ₄ ·4H ₂ O – 0,17 Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ – 7; C ₄ H ₆ CaO ₄ – 0,8;	24 год	$5,1 \pm 1,3 \times 10^9$	pH = 7,2 t=37°C 200 об/хв	Штанько Т. В. Біологічні властивості бацил та лактобактерій, перспективних для створення комплексного пробіотика: Автореф. дис. канд. біо. наук. Київ. – 2009. -23 с.
<i>Bacillus subtilis</i> 1.1	м'яса – 23; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 4,6; K ₂ HPO ₄ – 2,0;	36 год	$3,6 \pm 0,2 \times 10^{10}$	pH = 7,5 t=37°C 200 об/хв	Нечипуренко О.О., Хархота М.А., Бордунос К.С., Авдєєва Л.В. Ріст і утворення каротинів штамми <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> УКМ в-5113 та <i>Bacillus subtilis</i> 1.1в умовах глибинного культивування // Мікробіол. Журн.-2015. – №2 – С. 41-48

	FeSO ₄ -0,035				
<i>Bacillus subtilis</i> ВКПМ N В-2335	NH ₃ – 0,27; глюкоза (медична або технічна) – 8; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,375; FeSO ₄ – 0,001; MnSO ₄ – 0,030; NaCl – 1; CaCl ₂ – 0,150; Соєво – крейдяний крохмаль – 20	24,5 год	10,4±4,1 × 10 ⁹	t=37°C, 500 об/хв, аерація 0,7 л повітря на 1 л середовища/хв, рН=7,9.	Пат.№ RU2132196C1 Спосіб одержання еубіотичного біоспорину/ И.А. Поберий, А.Т. Харченко, В.В. Кузнецов, В.А. Філін, А.Н. Доронін, В. В. Смирнов, І. Б. Сорокулова Опуб. 27.06.1999
<i>Bacillus subtilis</i> УКМ 5139	Глюкоза-1,5; Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ – 1,29; (NH ₄) ₂ HPO ₄ – 4,75; KH ₂ PO ₄ – 9,6; MgSO ₄ × 7H ₂ O – 0,18	24 год	7,6±1,65×10 ⁹	рН = 6,7 t=37°C 200 об/хв	Хархота М.А., Осадчая А. И., Авдеева Л.В. Особенности роста пробиотических штаммов <i>Bacillus subtilis</i> при совместном глубинном культивирован // Мікробіол. журн. - 2011. - Т. 73, № 6. – С. 25-31.

За даним таблиці 2.1 для подальшого аналізу відібрано декілька штамів виду *Bacillus subtilis*, які мають різний пробіотичний ефект. Штам *Bacillus subtilis* 1.1 характеризується антагоністичною активністю до великої кількості бактерій та має найвищий вихід біомаси - $3,6 \pm 0,2 \times 10^{10}$ КУО/л, це означає що він чудово підійде для виробництва пробіотичних перпаратів. Штам *Bacillus subtilis* 3 використовується у пробіотичному препараті у комбінації з *L.plantarum* 8R-A3 та *B.licheniformis* 31, для лікування кишечника новонароджених. *Bacillus subtilis* УКМ 5139 складає основу препарату Ендоспорин, створеного для профілактики і лікування різних кишкових інфекцій. *Bacillus subtilis* ВКПМ N В-2335 використовується для отримання Біоспорину, призначеного для лікування та профілактики шлунково-кишкових захворювань людини, спричинених патогенними та умовно-патогенними мікроорганізмами, а також дисбіозу, спричиненого етіологічно різноманітними факторами (інфекції, антибіотики та хіміотерапія, іонізуюче випромінювання, гострі та хронічні інтоксикації тощо).

Дані штами різняться виходом біомаси, складом поживного середовища та часом культивування. Найвищим виходом біомаси характеризується штам *Bacillus subtilis* 1.1 - $3,6 \pm 0,2 \times 10^{10}$ КУО/л за 36 год культивування. На другому місці за виходом біомаси два штами: *Bacillus subtilis* УКМ 5139 за 24 години нарощує $7,6 \pm 1,65 \times 10^9$ КУО/л, *Bacillus subtilis* ВКПМ N В-2335 за 24.5 години - $10,4 \pm 4,1 \times 10^9$ КУО/л (табл. 2.1).

Тому на наступному етапі вибору біологічного агента порівнювали вартість поживних середовищ, використовуваних для культивування штамів з найбільшим виходом біомаси.

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів біомаси

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
<i>Bacillus subtilis</i> 1.1	меляса– 23	18	0,414	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 4,6	60	0,276	2
	K ₂ HPO ₄ – 2,0	150	0,3	3
	FeSO ₄ – 0,035	4	0,00014	4
Вартість 1л середовища – 0,99 грн				
<i>Bacillus subtilis</i> ВКПМ N В-2335	NH ₃ – 0,27	9,60	0,002592	5
	глюкоза (медична або технічна) – 8;	31,20	0,25	6
	MgSO ₄ ·7H ₂ O –0,375	9,60	0,0036	7
	FeSO ₄ – 0,001;	4	0,000004	4
	MnSO ₄ – 0,030;	24,50	0,000735	8
	NaCl – 1;	65	0,065	9
	CaCl ₂ – 0,150;	15,60	0,00234	10

	Соєво – крейдянй крохмаль – 20	190	3,8	–
Вартість 1л середовища – 4,12 грн				
<i>Bacillus subtilis</i> УКМ 5139	Глюкоза-3,75	31,20	0,117	6
	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ -1,29	105	0,13545	11
	(NH ₄) ₂ HPO ₄ – 4,75	89	0,42275	12
	KH ₂ PO ₄ – 9,6	55	0,528	13
	MgSO ₄ × 7H ₂ O – 0,18	9,60	0,001728	7
Вартість 1л середовища –1,20 грн				

Примітка * 1- <https://harkov.flagma.ua/uk/melyasa-malyas-patoka-buryakova-o3412141.html>; 2-<https://prom.ua/ua/p1033366390-ammonij-sulfatpo-polsha.html>; 3- <https://prom.ua/ua/p260995616-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>; 4-
<https://prom.ua/ua/p513547725-zheleznyj-kuporos-sulfat.html>; 5-<https://www.systopt.com.ua/item-amiak-vodnyj>; 6-
<https://www.systopt.com.ua/item-glyukoza>; 7- <https://www.systopt.com.ua/item-magnij-sirchanokyslyj-7-vodnyj-sulfat-magniyu> ; 8-
<https://prom.ua/ua/p667853692-marganets-ternokislyj-sulfat.html?&primelead=MC42>; 9-<https://prom.ua/ua/p907643454-natrij-hloristyj-farm.html?&primelead=Ml4zNg>; 10- <https://www.systopt.com.ua/item-kaltsij-hloristyj-hloryd-kaltsiyu>; 11-
<https://prom.ua/ua/p1030565732-tsitrat-natriya-331.html>; 12- <https://prom.ua/ua/p447361404-gidrofosfat-ammoniya-ammonij.html>;
13- <https://prom.ua/ua/p229298037-monokalijfosfat-kalij-fosfornokislyj.html>.

Проаналізувавши вартість 1 л поживного середовища, можна зробити висновки, що найдешевшим поживним середовищем для культивування буде *Bacillus subtilis* 1.1 ціна якого складає 0,79 грн за 1 літр середовища, на другому місці *Bacillus subtilis* УКМ 5139 – 1,15 грн , та найдорожче *Bacillus subtilis* ВКПМ N B-2335- 5,85 грн за 1 літр середовища.

В таблиці 2.3 проведено підрахунок вартості однієї дози препарату. Приймаємо, що вихід біомаси становить 5 г/л для всіх продуцентів, відповідно умовна вартість цільового продукту г/л ПС залежить від вартості літра ПС та часу культивування.

Таблиця 2.3.

Умовна вартість біомаси, синтезованої на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Концентрація КУО/л	Тривалість культивування, год	Кількість утворених КУО/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість дози цільового продукту, грн/доза
1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus subtilis</i> УКМ 5139	$7,6 \pm 1,65 \times 10^9$	24	$0,3 \times 10^9$	1,20	0,05
<i>Bacillus subtilis</i> 1.1	$3,6 \pm 0,2 \times 10^{10}$	36	$0,1 \times 10^{10}$	0,99	0,02
<i>Bacillus subtilis</i> - ВКПМ N B-2335	$10,4 \pm 4,1 \times 10^9$	24,5	$0,4 \times 10^9$	4,12	0,16

Дивлячись на ці дані можна зробити висновки, що найкращим штамом для виробничого культивування буде *Bacillus subtilis* 1.1, тому що він має досить високу концентрацію КУО, короткий час культивування та відносно дешеве поживне середовище. Також цей штам відповідає вимогам, що висуваються до пробіотичних штамів. Проявляє середню і високу антагоністичну активність до різних УПМ, здатний до росту за різних значень

pH та концентрації жовчі. Особливістю їх є те, що він здатний синтезувати пігменти каротиноїдної природи, який має провітамінну активність [9].

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Морфолого культуральні ознаки

Bacillus subtilis – непатогенна спороносна бактерія сімейства *Bacillaceae*. Грампозитивні спороутворюючі аеробні бактерії, довжиною 2 – 3 мкм, товщиною 0,4 мкм. Розмножуються поділом, на всій поверхні мають джгутики. Спори овальної форми, розміщені в центрі клітини. Для виділення культуральну рідину *Bacillus subtilis* кип'ятять, в процесі якого інші мікроби гинуть, а стійкі до високої температури спори *Bacillus subtilis* залишаються живими і подалі проростають. *Bacillus subtilis* строгий аероб, на поверхні рідких поживних середовищ утворюється тонка білувата плівка, а на поверхні агаризованих поживних середовищ утворюються круглі, сіруваті, гладенькі, блискучі колонії [14]. Але відомо що культура *B. subtilis* має високу мінливість культуральних властивостей. При їх рості на різних агаризованих середовищах відмічається до десяти типів колоній. На м'ясопептонному агарі утворюються шорохуваті колонії білого кольору, що вростають в поверхню поживного середовища. При культивуванні на елективному середовищі Гаузе №2 *B. Subtilis* здатні давати наступні типи колоній: круглої або амебо видної форми, великі випуклі з рівними або хвилястими краями, куполоподібні, зернисті або плоскі з виступаючим центром; матові, шорсткі, зморшкуваті. Забарвлення колоній зазвичай світло-сірого або бежевого кольорів з рожевим відтінком. Відзначають варіабельність ферментативної активності *Bacillus subtilis* в здатності утворювати сірководень, відновлювати нітрати до нітритів і потреби 3 – 12 % NaCl для зростання [17]. Дана бактерія відноситься до звичайних сапротрофів, які розкладають органічні речовини (вуглеводи, білки) [14].

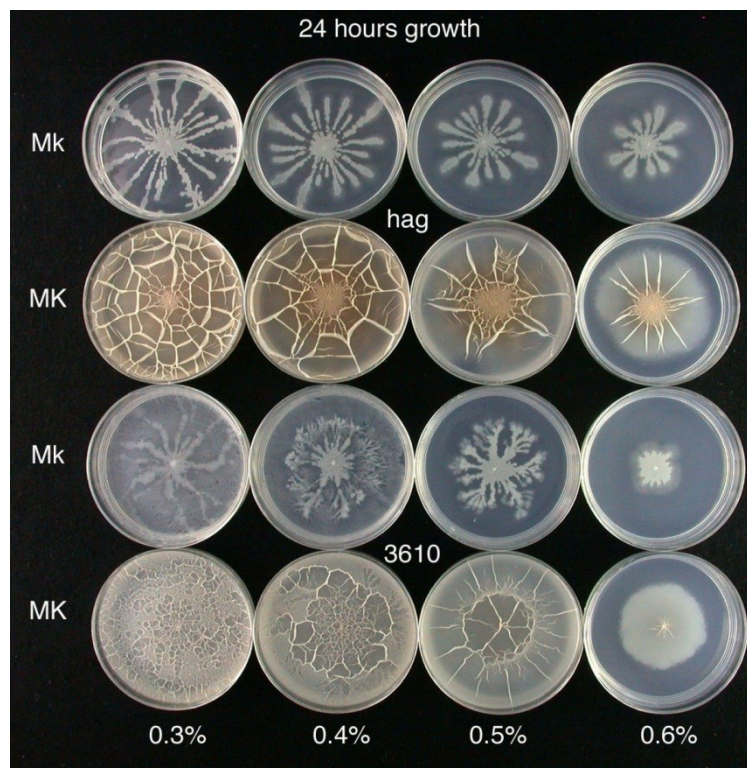


Рис. 2.1. Вигляд колоній *Bacillus subtilis* в залежності від поживного середовища

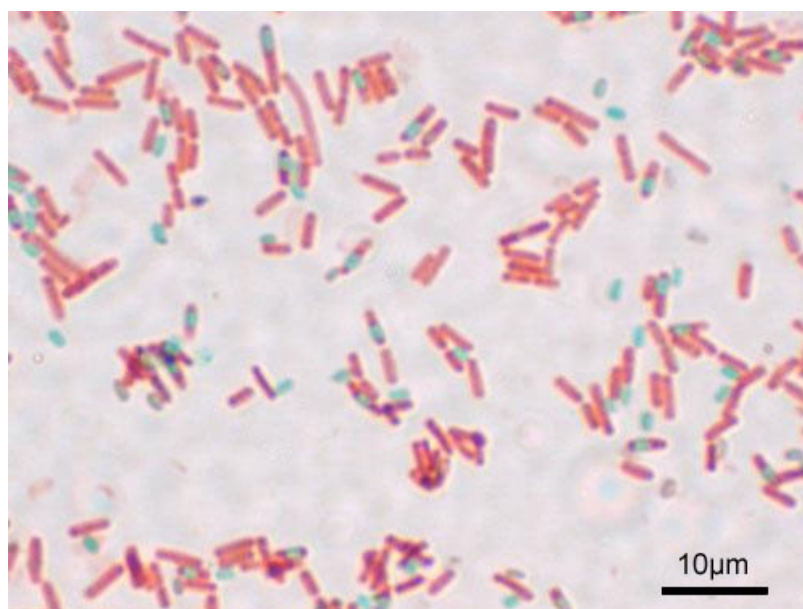


Рис. 2.2. Загальний вигляд бактерії *Bacillus subtilis*

Фізіолого-біохімічні ознаки

Bacillus subtilis – хемоорганогетеротроф, це аеробний мікроорганізм але має властивості факультативного анаеробна на агарі або бульйоні TGY. Каталаза-позитивна. Зростає при 15–55 ° С, оптимальне зростання здійснюється при температурі 28–30 ° С. Зростання 10% (мас. / Об.) NaCl відбувається через 72

год. Утворює ацетил-метилкарбінол (проба Фогеса – Проскауера) при рН 5,5–5,7. Гідролізує крохмаль і казеїн; відновлює нітрат до нітриту. Утилізується цитрат. Кислота виробляється з амігдаліну, глікогену, мелібіози, D -глюкози, целобіози, D- манітолу, D- сорбітолу та ескуліну цитрату заліза, як визначено за допомогою системи API CH 50 [18].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для *Bacillus subtilis* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [19].

Домен – *Bacteria*

Відділ – *Firmicutes*

Клас – *Bacillales*

Родина – *Bacillaceae*

Рід – *Bacillus*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО – ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у біомасі *Bacillus subtilis*

Вперше термін «пробіотик» було визначено Продовольчою та сільськогосподарською організацією ООН (ФАО)/ВООЗ у 2001 р., згідно якого: «пробіотики» – це мікроорганізми, які при вживанні в адекватній кількості приносять користь здоров'ю людини. У 2018 р. Міжнародною науковою асоціацією з питань пробіотиків і пребіотиків (ISAPP) було надано таке нове визначення «пробіотиків» – це живі мікроорганізми, прийом адекватних кількостей яких забезпечує позитивний вплив на організм хазяїна» [20].

У всьому світі щорічно збільшується кількість людей, які страждають від захворювань ШКТ і гепатобіліарної системи, а отже, потребують спеціалізованої гастроентерологічної допомоги.

За прогнозами експертів Всесвітньої організації охорони здоров'я, у XXI ст. хвороби органів травлення (ХОТ) посідатимуть одне з провідних місць у структурі захворюваності населення нарівні із серцево-судинною патологією. Факторами ризику виникнення цих захворювань є низька якість харчування, його незбалансованість, незадовільна організація харчування вдома і на роботі, психоемоційне перенапруження, самолікування, пізні звернення за кваліфікованою медичною допомогою [21].

Смертність від ХОТ в Україні посідає четверте місце у структурі смертності населення (після хвороб системи кровообігу, новоутворень і нещасних випадків). Серед окремих нозологічних форм у класі ХОТ в структурі смертності найвищу питому вагу (71,2 %) мають фіброз і цироз печінки (52,1 %), алкогольна хвороба печінки (9,6 %) і судинні ураження кишок (9,6 %) [21].

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.7 КР ПЗ</i>		
<i>Зми. Арк.</i>	<i>№ докum.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Нагорна Т.С.</i>			<i>РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Старовойтова С.О.</i>					24	77
<i>Н. контр.</i>					24		
<i>Консульт.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>						

Встановлена негативна динаміка коефіцієнта смертності від ХОТ серед працездатного населення як у містах, так і у сільській місцевості. Смертність чоловіків працездатного віку від ХОТ удвічі вища за смертність жінок як у містах, так і у сільській місцевості [21].

Суттєвим аргументом, що визначає медико-соціальну значимість хвороб органів травлення, є те, що від цієї патології страждають всі вікові групи населення — особи працездатного віку, літні й старі, діти та підлітки. Так, серед дорослого населення у структурі поширеності гастроентерологічні захворювання посідають третє місце, серед дітей та підлітків — друге. ХОТ поширені майже з однаковою частотою серед дорослих та підлітків, вдвічі менша частота поширення їх серед дітей. Більшість пацієнтів з гастроентерологічною патологією, знаходилися в працездатній групі населення, поширеність серед міського населення у 2 рази вища, ніж серед сільського (Рис. 1) [21].

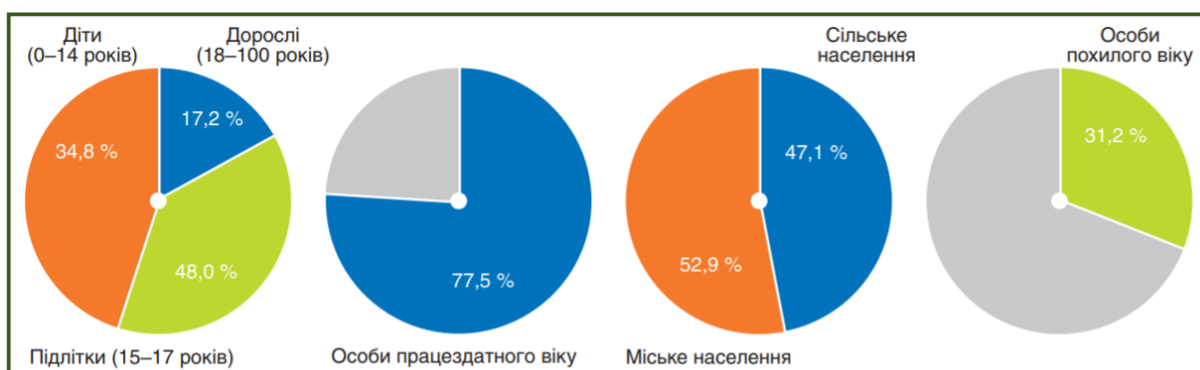


Рисунок 3.1. Розподіл поширеності ХОТ серед різних категорій населення

Бактерія *B.subtilis* є одним з найбільш перспективних пробіотиків, вивчених в останнє десятиліття. Механізми її пробіотичної дії зв'язані з синтезом протимікробних речовин, підсиленням неспецифічного і специфічного імунітету, стимуляцією зростання нормальної мікрофлори шлунку та виділенням травних ферментів. *B.subtilis* виділяє рибосомально синтезовані пептиди, нерибосомально синтезовані пептиди і непептидні речовини з широким спектром протимікробної активності, які охоплюють грам-позитивні, грам-негативні бактерії, віруси та гриби. Резистентність до даних протимікробних речовин виникає рідко. Підсилення неспецифічного імунітету

зв'язане з активацією макрофагів і вивільненням з них протизапальних цитокінів, підвищенням бар'єрної функції слизової оболонки шлунку, виділенням вітамінів та амінокислот. Пробиотик виділяє в просвіт шлунку всі основні травні ферменти:амілази, ліпази, протеази, пектинази та целюлази. На додаток до перетравлення їжі дані ферменти руйнують анти харчові фактори та алергічні речовини, які містяться в їжі. Перераховані механізми дії роблять обґрунтованим застосування *B.subtilis* в складі комплексної терапії для боротьби з кишковими інфекціями; профілактики респіраторних інфекцій в холодний час року; профілактики діареї спровокованої прийманням антибіотиків; для корекції порушення перетравлювання і просування їжі. *B.subtilis* зазвичай не викликає побічні ефекти. Для даного пробіотика характерне високе співвідношення ефективності та безпеки [11].

Пробиотики на основі *B.subtilis* зазвичай приймають перорально у вигляді спор або живих бактерій (вегетативних клітин). Виживання спор в ШКТ не викликає сумнівів у зв'язку з їх високою стійкістю до дії різних фізико-хімічних факторів, включаючи екстримальні значення рН [11].

На даний час на ринку України існує безліч пробіотиків діючою речовиною яких є *Bacillus subtilis*, які випускаються як вітчизняним так і закордонними виробниками, список цих препаратів та їх виробників наведено в таблиці 3.1. [22].

Таблиця 3.1.

Препарати аналоги

Назва препарату	Компанія виробник
Субалін	ПрАТ "Біофарма", м. Київ, Україна
Біоспорин	ПрАТ "Біофарма", м. Київ, Україна
Бактиспорин	ИММУНОПРЕПАРАТ (Россия)
Ветом	НПФ Исследовательский

	центр, Россия
Споробактерин	БАКОРЕН, ООО (Россия)

Серед представлених вище пробіотиків найбільше увагу привертає препарат Бактиспорин. Цей препарат володіє антагоністичною активністю, пригнічуючи зростання патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів. Також цей ферментний препарат сприяє розщепленню білків, жирів, вуглеводів та клітковини, покращуючи травлення та засвоєння їжі, сприяючи очищенню ран та запальних вогнищ [23].

В таблиці 3.2 наведено дані для розрахунку річної потреби біомаси для одержання препарату Бактиспорин.

Таблиця 3.2.

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в біомасі *Bacillus subtilis* для одержання пробіотику «Бактиспорин»

Захворювання (профілактика)	Доза препарату на добу, мг [23]	Кількість біомаси на добу, мг [23]	Кількість прийому ампул на добу, шт. [23]	Тривалість прийому, днів [23]	Кількість препарату на одну людину, г	Кількість хворих в Україні станом на 2021 рік [21]	Загальна кількість прийому ампул на всіх хворих, шт	Загальна кількість препарату на всіх хворих кг/рік
Лікування хвороб органів травлення	440	397	2	10	3,97	831 767,08	16 635 341,6	3302,1

Станом на 2021 рік на хвороби органів травлення хворіло 2000 випадків на 100 тис. населення [21]. Враховуючи, що кількість населення складає 41 588 354 [24], то загальна кількість буде становити:

$$N_{\text{хв}} = \frac{41\,588\,354 \times 2000}{100\,000} = 831\,767,08$$

Згідно інструкції щодо застосування препарату, до складу входить 5×10^9 живих мікробних клітин *Bacillus subtilis*, рекомендований термін вживання становить по 1 ампулі 2 рази на добу протягом 10 днів [23].

В одній дозі препарату бактиспорин знаходиться біомаса *Bacillus subtilis* 3Н в дозі $1 \cdot 5 \cdot 10^9$ живих мікробних клітин, концентрація дози – 95% бактерій та 5 % захисного середовища [25].

В якості розчинника можна використовувати фізіологічний розчин, дистильовану або кип'ячену воду. В якості захисного середовища використовується лактоза, наявність даного середовища обумовлено захисною дією під час ліофільного висушування препарату [25].

Оскільки на упаковці та листку вкладиші не вказана вага однієї дози, тому проводилось зважування на аналітичних вагах у лабораторії. Було встановлено, що вміст ампули, тобто дози, важить 220 мг. Враховуємо вологу 5%, та захисне середовище 5% [25] тоді вміст культури становить 198,5 мг, а вміст захисного середовища 11 мг.

Враховуючи те, що доза препарату важить 198,5 г, а згідно з інструкцією потрібно приймати 2 дози в день 10 днів [23], то доза препарату на добу складає $198,5 \text{ мг} \cdot 2 = 397 \text{ мг}$, а кількість препарату на одну людину буде складати $10 \text{ днів} \cdot 397 \text{ мг} = 3,97 \text{ г}$.

Згідно отриманих даних в Україні в рік хвороби органів травлення непокоять 831 767,08 людей. А курс лікування для однієї людини передбачає використання 3,97 г препарату.

$$831\,767,08 \text{ людей} \times 3,97 \text{ г/людину} = 3\,302\,115,30 \text{ г/рік} = 3302,1 \text{ кг/рік}$$

Бактиспорину.

Отже, річна потреба препарату Бактиспорину (*Bacillus subtilis*) для лікування хвороб органів травлення становить 3480,1кг.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Бактиспорин – це російський пробіотик який виробляє компанія «Іммунопрепарат». Візьмемо в рахунок те, що бактиспорин це не єдиний препарат який має як діючу речовину *Bacillus subtilis* (таблиця 3.1), а також те, що існують інші препарати які мають аналогічну терапевтичну дію, на основі інших біологічних агентів. Припустимо, що ми забезпечимо 6% ринку України даним препаратом.

З попередніх розрахунків був вибраний біологічний агент *Bacillus subtilis* 1.1, продуктивність якого становить $X_{кр} = 4,5$ г/л [5].

Плануємо, що вибрану кількість продукту будемо виробляти $T_{рд} = 250$ робочих днів. Для подальших розрахунків потрібно знати тривалість виробничого циклу. $T_{ф} = 36$ год. Суха залишкова волога в отриманому продукті буде становити $W = 4\%$, а сухої речовини $CP = 0,96$.

Розрахуємо потребу у біомасі *Bacillus subtilis* 1.1 з реалізацією даного препарату в Україні на рівні 6% від всієї кількості препаратів на ринку.

Потужність виробництва складає:

$$G_{нп} = 3302,1 \times 0,06 = 198,1 \text{ кг.}$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для забезпечення пробіотика «Бактиспорин» біомасою *Bacillus subtilis* 1.1 необхідно отримати 198,1 кг.

Прийmemo, що кількість трудоднів в році становить $T_{рд} = 280$ днів. За літературними даними найвищий рівень синтезу біомаси ($X_{кр} = 4,5$ г/л за 36 годин культивування) досягається за умов росту штаму *Bacillus subtilis* 1.1. для проведення подальших розрахунків прийmemo наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера $T_{цф} = T_{ф} + T_{по} = 36 + 10,5 = 46,5$ год, де $T_{ф}$ - час культивування; $T_{по}$ -час проведення підготовчих операцій. Коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій) $K_1 = 1,1$. Сумарні витрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту (центрифугування – 5-7%, ліофілізація 3-4%, подрібнення 3-4%, просіювання 4-5%)), частка $E_{св} = 0,1$.

1. Кількість продукту на добу:

$$G_{\text{нтд}} = G_{\text{нп}} / T_{\text{рд}} = 198,1 / 280 = 0,71 \text{ кг/добу}$$

2. Кількість біомаси за цикл

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{нтд}} \times T_{\text{цф}} / 24 = 0,71 \times 46,5 / 24 = 1,37 \text{ кг/цикл}$$

3. Об'єм КР, що заливається за одну ферментацію (цикл) з врахуванням втрат при виділенні готового продукту, а також за рахунок можливих нестерильних операцій :

$$V_{\text{кр}} = K_1 \times G_{\text{цк}} \times C_{\text{рп}} / X_{\text{кр}} (1 - E_{\text{св}}) = 1,1 \times 1,37 \times 0,96 / 4,5 \cdot (1 - 0,1) = 0,29 \text{ м}^3.$$

4. Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{\text{цк}} = G_{\text{нп}} / G_{\text{цк}} = 198,1 / 1,37 = 145 \text{ циклів.}$$

Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

Кількість поживного середовища (ПС) та посівного матеріалу (ПМ) в ферментері до культивування становить:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 0,29 / (1 - 0,1) = 0,32 \text{ м}^3$$

Кількість поживного середовища в ферментері складе:

$$V_{\text{пс}} = V_{\text{ф}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 0,32 / (1 + 0,1) = 0,29 \text{ м}^3$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву ферментера:

$$V_{\text{пмф}} = V_{\text{ф}} - V_{\text{пс}} = 0,32 - 0,29 = 0,03 \text{ м}^3$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_3 = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе:

$$V_{\text{гф}} = V_{\text{ф}} / K_3 = 0,32 / 0,6 = 0,53 \text{ л}$$

Приймаємо, що найближчий стандартний ферментер має об'єм $0,63 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

$$K_3 = V_{\text{цк}} / V_{\text{ф}} = 0,29 / 0,63 = 0,5$$

Даний коефіцієнт заповнення не перевищує допустимі межі, тому оптимальним для використання буде ферментер об'ємом $0,63 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення $0,6$.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу біомаси *Bacillus subtilis* 1.1.

За виробничий цикл отримують $V_{кр}=0,29 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини враховують втрати під час крапле виносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10-15%.

Отже, кількість поживного середовища перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб1} = \frac{V_{кр}}{1-Еф} = \frac{0,29}{1-0,15} = 0,34 \text{ м}^3.$$

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері об'ємом $V_{роб1}=0,34 \text{ м}^3$.

При обраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,5 - 0,6$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера:

$$V_{ф} = \frac{V_{роб1}}{K_{зап}} = \frac{0,34}{0,6} = 0,57 \text{ м}^3.$$

Приймаємо, що найближчий стандартний ферментер $V_{сф1}=0,63 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап1} = \frac{V_{роб1}}{V_{сф1}} = \frac{0,34}{0,40} = 0,54.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує допустимих меж, тож геометричний об'єм ферментера обраний вірно.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді, кількість поживного середовища в ферментері становить:

$$V_{пс1} = \frac{V_{роб1}}{1+Хф} = \frac{0,34}{1+0,1} = 0,31 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб1} - V_{пс1} = 0,34 - 0,31 = 0,03 \text{ м}^3$$

Для одержання $0,03 \text{ м}^3$ посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті крапле виносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10-15%.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб}2} = \frac{V_{\text{пм}1}}{1 - \text{Епа}} = \frac{0,03}{1 - 0,15} = 0,035 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища.

Тоді, кількість поживного середовища в інокуляторі становить:

$$V_{\text{пс}2} = \frac{V_{\text{роб}2}}{1 + \text{Хпа}} = \frac{0,035}{1 + 0,1} = 0,032 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм}2} = V_{\text{роб}2} - V_{\text{пс}2} = 0,035 - 0,032 = 0,003 \text{ м}^3$$

Інокулят об'ємом $V_{\text{роб}2} = 0,035 \text{ м}^3$ можна отримати під час культивування у інокуляторі об'ємом:

$$V_{\text{ін}2} = \frac{V_{\text{роб}2}}{K_{\text{зап}}} = \frac{0,035}{0,6} = 0,06 \text{ м}^3.$$

Приймаємо, що найближчий стандартний ферментер $V_{\text{сф}2} = 0,06 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}2} = \frac{V_{\text{роб}2}}{V_{\text{сф}2}} = \frac{0,035}{0,06} = 0,58.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує допустимих меж, тож геометричний об'єм ферментера обраний вірно.

Кількість посівного матеріалу для засіву в інокулятор $V_{\text{пм}2} = 0,003 \text{ м}^3$ (3 л) можна отримати культивуванням бактерій в колбах на качалці. Для цього використовують колби об'ємом 1 л з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм}2}}{V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}} = \frac{3}{1 \cdot 0,6} = 5$$

Отже для одержання посівного матеріалу необхідно 5 качалочних колб.

Таким чином, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу біомаси у ферментері об'ємом $0,63 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення 0,6 проходитиме в три етапи.

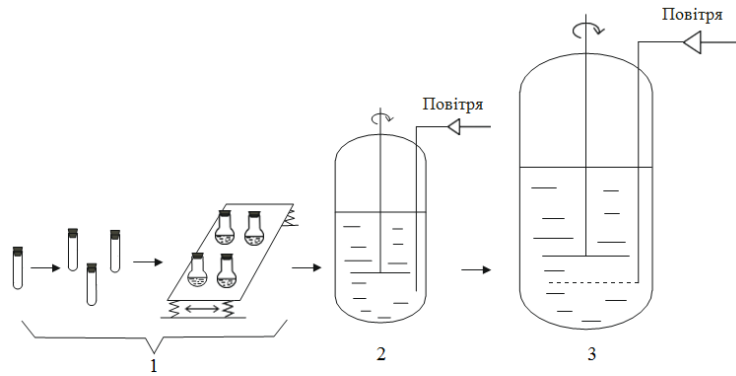


Рисунок 3.2. Схема приготування посівного матеріалу *Bacillus subtilis* 1.1.

1 – вирощування у колбах на качалці (5 колб)

2 – вирощування в інокуляторі об'ємом $0,06 \text{ м}^3$ (робочий об'єм $0,035 \text{ м}^3$)

3 – вирощування у ферментері який має об'єм $0,63 \text{ м}^3$ (робочий об'єм $0,34 \text{ м}^3$)

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Оскільки *Bacillus subtilis* 1.1. є аеробним мікроорганізмом, з нейтральним рН, та оптимальною температурою 30 °С, то можливий ризик контамінації з іншими мікроорганізмами. Це зумовлює необхідність асептичних умов під час біосинтезу, що неможливо досягти при поверхневому культивуванні. Для запобігання контамінації використовують стерилізацію обладнання і комунікацій, поживного середовища, аераційного повітря та піногасників. В ферментері створюється надлишковий тиск подачею стерильного аераційного повітря.

Відомо що, за глибинного культивування бактерій максимальної продуктивності можна досягнути у певній фазі їх росту. Зважаючи на це та на викладені вище умови культивування *Bacillus subtilis* 1.1. виконується глибинним способом.

У даному випадку оптимальним буде періодичне культивування, оскільки забезпечити строго асептичні умови під час безперервного культивування неможливо.

В залежності від умов культивування конструкція і оснащення ферментера може відрізнитися. Для проведення процесу основного біосинтезу необхідно обрати біореактор, який зможе задовольнити усі потреби культури.

1. У процесі культивування *Bacillus subtilis* 1.1. аеробні умови при глибинному культивуванні створюються за допомогою барботера який подає аераційне повітря в ферментер, з коефіцієнтом аерації 0,7 дм³/хв.

					НУХТ БТЕК 04.01.7 КР ПЗ			
<i>Зми.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ док.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Нагорна Т.С.</i>			РОЗДІЛ 4.Обґрунтування вибору технологічної схеми	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>		<i>Старовойтова С.О.</i>					34	77
<i>Н. контр.</i>						34		
<i>Консульт</i>						Кафедра БТМ		
<i>Затверд.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						

2. Для інтенсифікації масообмінних процесів та кращої гомогенізації культуральної рідини ферментер повинен бути оснащений відкритою турбінною мішалкою із частотою обертання 200 об/хв. Вирощування інокуляту в колбах здійснюється на качалках з частотою 200 об/хв.

3. Для забезпечення сталої температури культивування ферментер повинен бути оснащеним сорочкою і датчиком температури.

4. При аерації та змішуванні культуральної рідини, меляса може утворювати товстий шар піни, для запобігання цієї проблеми можна використати механічний спосіб піногасіння, його принцип полягає у встановленні мішалки у верхній частині апарата, яка по команді датчика обертається і розбиває піну.

5. Для контролю рівня кислотності культуральної рідини ферментер оснащується датчиком рН [13].

Для культивування нам необхідний ферментер об'ємом 0,63 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6. Для даної роботи підійде ферментер компанії Sysbiotech, адже вони мають повністю асептичний дизайн і можуть бути легко перевірені, а також мають розширену систему управління яка дозволяє легко інтегрувати вихідне обладнання в єдину виробничу лінію: біореактор, сепараційне обладнання, сублимаційну сушку та СІР-станцію. За всім обладнанням можна контролювати з одного комп'ютера для комфортного керування процесом, що дозволяє легко передавати дані про вирощування [26].

4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Оскільки *Bacillus subtilis* 1.1. є аеробним мікроорганізмом, з нейтральним рН, та оптимальною температурою 30 °С, то можливий ризик контамінації з іншими мікроорганізмами. Це зумовлює необхідність асептичних умов під час біосинтезу, що неможливо досягти при поверхневому культивуванні. Для запобігання контамінації використовують стерилізацію обладнання і комунікацій, поживного середовища, аераційного повітря та піногасників. В ферментері створюється надлишковий тиск подачею стерильного аераційного повітря.

Для стерилізації повітря в боксах та лабораторіях, де працюють з посівною культурою та інокулятом, використовують УФ-лампи (ультрафіолетове опромінення).

Стиск і очищення повітря проходить в три стадії.

На першому етапі турбокомпресор втягує атмосферне повітря через впускний вал висотою 20-30 м, саме на цій висоті стабілізована концентрація мікроорганізмів. Спершу повітря надходить у фільтр попередньої очистки, де звільняється від грубого аерозолю-пилу. Другим етапом є охолодження повітря при високій вологості. Повітря охолоджується в теплообміннику до температури -25-40°C, а потім нагрівається до температури 70-90°C. При таких температурах утворення конденсату виключено. Третій етап складається з фільтрів вторинної та третинної очистки. Вторинні фільтри або первинні фільтри зазвичай розташовуються на заводі поруч із цехом. Головний фільтр очищає повітря для всіх ферментаційних ємностей в цеху. Повітря з головного фільтру через колектор направляється в індивідуальні фільтри третього рівня, встановлених на кожному ферментері, незалежно від його потужності.

В якості основного фільтра рекомендується використовувати нетканий фільтруючий матеріал великого об'єму (тканина Камінського), оскільки під час його виготовлення в прядильний розчин додається консервант гексахлорфенол, тому цей фільтр не потребує стерилізації.

В якості третинних фільтрів можуть використовуватися фільтри Петрянова, які складаються з ультратонких полімерних волокон, утворених у вигляді тканини на марлевій підкладці [27].

4.1.3. Обґрунтування стадії вибору мийних та дезінфікувальних засобів

Для виробництва пробіотичного препарату на основі *Bacillus subtilis* 1.1 потрібно спланувати допоміжні стадії виробництва, які обираються з урахуванням особливостей культивування мікроорганізму та виробничого процесу. Виробництво спланованого препарату здійснюється упродовж 280 днів та за цей час відбувається 145 виробничих циклів (див. розділ 3).

У виробничому приміщені буде встановлено ферментер (630 л), інокуляторі (60 л), збірники, автоклав, качалки та інше обладнання. Таким чином оптимальна площа для виробничого приміщення буде складати 54 м² (9×6 м), а висота стін складає 2,5 м. Отже загальна площа стін буде складати: $((9 \cdot 2,5) + (6 \cdot 2,5)) \cdot 2 = 75 \text{ м}^2$. Площа підлоги - 54 м². Визначимо площі поверхонь, які необхідно мити та (або) дезінфікувати (табл. 4.3.1).

Оскільки обробка обладнання та приміщення відбувається перед кожним циклом, а кількість циклів складає 180, то загальна кількість процесів миття/дезінфекції за весь час складе 181 (додаткове прибирання після закінчення циклів). Загальна площа миття становитиме: $0,40 \cdot 181 = 72,4 \text{ м}^3$.

Для того щоб забезпечити чистоту приміщення, миття підлоги буде здійснюватися кожного дня, тобто 280 разів. А миття стін, дверей і вікон раз на тиждень, тобто 40 разів.

Таблиця 4.1.3.1.

Розрахунок загальної площі миття та (або) дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва пробіотичного препарату на основі *Bacillus subtilis* 1.1

Об'єкт миття та (або) дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (л)	Кількість процесів миття та (або) дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та (або) дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнання, інвентар, комунікації	1200 л	146	175200
Підлога	54	280	15120
Стіни, двері, вікна	75	40	3000

Обґрунтування вибору мийних та дезінфікувальних засобів

Для того щоб обрати мийчий та дезінфікуючий засіб, необхідно враховувати його вартість та витрати на оброблювання певної площі виробничого приміщення та устаткування. Приблизно на 1 м² затрачається 100 мл робочого мийного чи дезінфікувального розчину (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 № 502) [28]. Мийчі та дезінфікуючі засоби обиралися з Державного реєстру дезінфекційних засобів 2021 року [29].

Таблиця 4.1.3.2.

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів

Назва мийчого/ дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття/ дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття/ дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг робочого мийного/дезінфікувального розчину, грн	Загальна вартість варті вар миття/дезінфекції за весь період виробництва, грн
Каустична ^{*1} сода	Обладнання, інвентар, комунікації	2	175200	87600	0,6	105 120
Хлоросепт ^{*2} Лонг	Обладнання, інвентар, комунікації	22,5	175200	87600	34,90	6 114 480
Hydrogen [*] ₃ peroxid profi	Обладнання, інвентар, комунікації	6	175200	87600	2,92	511 584
Аноліт ^{*4}	Стіни,	0,05	15120	1512	0,045	680,4

ЕкоСвіт	підлога , вікна, двері, інвентар					
Полідез ^{*5}	Стіни, підлога , вікна, двері, інвентар	11,9	15120	1512	14,28	215 913,6
Гіпохлорит ^{*6} натрію	Стіни, підлога , вікна, двері, інвентар	1	15120	1512	0,1	1512

Примітка * 1 – https://imetalua.com/soda_kausticheskaya/ ; 2 – <https://firma-reagent.com.ua/ua/p578785485-dihlorantin-dihlor-dimetilgidantoin.html> ; 3 – <https://vladasept.com.ua/ua/p1187336727-hydrogen-peroxid-profi.html> ; 4 – http://anolit.eco/disinfection_of_the_house_the_hall_of_sorrow/tproduct/301831254-679195810571-unversalnii-anolt-ekosvt-5l ; 5 – <https://prom.ua/ua/p1145278371-dezinfetsiruyuschee-sredstvo-polidez.html?&primelead=MS41> ; 6 – <https://novohim.com.ua/ua/catalog/vodopidgotovka-dlya-basejniv/natrij-gipoxlorit-2/>

Розрахунок вартості 1 л робочого розчину:

Каустична сода. В 1 літрі робочого розчину знаходиться 2% концентрату, це складає 0,02 л діючої речовини, ціна якої складає 30 грн. Отже $30 \cdot 0,02 = 0,6$ грн – літр робочого розчину.

Хлоросепт Лонг. В 1 літрі робочого розчину знаходиться 22,5 % концентрату, це складає 0,225 л діючої речовини, ціна якої складає 155 грн. Отже $155 \cdot 0,225 = 34,90$ грн – літр робочого розчину.

Hydrogen peroxid profi. В 1 літрі робочого розчину знаходиться 6 % концентрату, це складає 0,06 л діючої речовини, ціна якої складає 46,8 грн. Отже $46,8 \cdot 0,06 = 2,92$ грн – літр робочого розчину.

Аноліт ЕкоСвіт. В 1 літрі робочого розчину знаходиться 0,05 % концентрату, це складає 0,0005 л діючої речовини, ціна якої складає 90 грн. Отже $90 \cdot 0,0005 = 0,045$ грн – літр робочого розчину.

Полідез. В 1 літрі робочого розчину знаходиться 11,9 % концентрату, це складає 0,119 л діючої речовини, ціна якої складає 120 грн. Отже $120 \cdot 0,119 = 14,28$ грн – літр робочого розчину

Гіпохлорит натрію. В 1 літрі робочого розчину знаходиться 1% концентрату, це складає 0,01 л діючої речовини, ціна якої складає 10,2 грн. Отже $10,2 \cdot 0,01 = 0,1$ грн – літр робочого розчину.

Проаналізувавши дані наведені у таблиці 2.2. можна зробити такі висновки:

- Для миття обладнання, інвентарю та комунікацій доцільніше використовувати засіб каустична сода;
- Для миття стін, підлоги, вікон, дверей та інвентарю краще використовувати Аноліт ЕкоСвіт;

Засоби слід міняти раз у 3 місяці для того щоб запобігти резистентності мікроорганізмів [28].

4.1.3.1. Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій

Миття та ополіскування ємнісного обладнання

Для миття та ополіскування ємнісного обладнання буде використовуватись СІР-мийка. Тому що цей спосіб дає можливість знизити витрати робочого часу, та більш економічно використовувати миючі та дезінфікуючі розчини, а також зменшується зношуваність обладнання і не виходять з ладу з'єднання, прокладки, заглушки та ін [30].

Після миття також проводиться ополіскування обладнання гарячою технічною водою протягом 15 хв.

Стадія технічного огляду

Після миття та ополіскування ємнісного обладнання проводять його технічний огляд з метою виявлення можливих не ущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. У разі їх знаходження проводять підтягування різьбових з'єднань [31].

Перевірка на герметичність

Для перевірки на герметичність на апараті закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря поки надлишковий тиск не складатиме $P=0,1-0,2$ МПа. Потім перекривають вентиль подачі повітря і фіксують покази манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. І якщо падіння тиску не буде перевищувати 0,01 МПа, буде вважатися що апарат герметичний. В іншому випадку здійснюється пошук не ущільнень за допомогою галогенових течієпошукачів. Перед набором тиску в апарат вносять невелику кількість легкої галогеновмісної речовини, зазвичай чотирихлористий карбон (CCl_4), шестифтористий сульфур (SF_6) або фреон-12, закривають усю запірну арматуру, апарат нагрівають до температури $80^\circ C$ і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа. Пари галогеновмісної речовини проникають через не ущільнення і виявляються у разі наближення щупа течіє шукача до них. Тривалість перевірки одного апарату триває 1,5 – 2 години [31].

Стерилізація обладнання та комунікацій

Для стерилізації обладнання та комунікацій використовують стерилізацію водяною насиченою парою з тиском $P= 0,28-0,3$ МПа. Цей процес умовно поділяється на такі етапи: нагрівання апарата, стерилізація, охолодження.

Нагрів апарата. Під час стерилізації апарата попередньо в сорочку подають глуху пару і прогрівають апарат до температури $80-90^\circ C$.

Стерилізація. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через барботер або нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з

апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації $t_{ст} = 130-135\text{ }^{\circ}\text{C}$ закривають усю запірну арматуру на апараті, крім парової, і витримують заданий час стерилізації. При стерилізації апарата паралельно стерилізуються індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря.

Охолодження. Закривається уся запірна арматура подачі пари в апарат. У сорочку подається холодна вода. Для компенсації падіння тиску в апарат подають стерильне повітря. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури до $30-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ і надлишкового тиску $P=0,003-0,005\text{ МПа}$ [31].

4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний синтез біомаси *Bacillus subtilis* 1.1 ($3,6 \pm 0,2 \times 10^{10}$) досягається під час росту на напів синтетичному середовищі такого складу (г/л): меляса– 23; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4,6; K_2HPO_4 – 2,0; FeSO_4 –0,035 [6].

Згідно розрахунків у розділі 1, виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом $0,63\text{ м}^3$, що містить $0,34\text{ м}^3$ середовища. Одержання інокуляту відбувається у 3 етапи (у колбах на качалці, інокуляторі – 60 л та ферментері – 630л).

Також при приготуванні поживного середовища є необхідність використання титрувальних агентів, у вигляді 6%-й розчину HCl та 6% розчином NaOH (обґрунтування їх використання знаходиться в підрозділі 5.4.1.).

4.1.4.1. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Bacillus subtilis* 1.1., умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: Меляса (режим стерилізації: 112°C , 30 хв).

Композиція Б: FeSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (режим стерилізації: 131°C , 40 хв).

Композиція В: K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131°C , 40 хв).

Меляса (компонент А) є термолабільним і потребує м'якого режиму стерилізації. Солі композиції Б стерилізуються при стандартній для солей

температурі. Фосфати (композиція В) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинного фосфату заліза. Стерилізацію всіх композицій здійснюють в автоклаві.

4.1.4.2. Вирощування інокуляту в посівних апаратах об'ємом 60 л

Стерилізація 60 л поживного середовища, необхідних для цих стадій, здійснюється у відповідних посівних апаратах, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: Меляса (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція Б: FeSO₄, (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄ (режим стерилізації: 131 °C, 40 хв, рН 7,0-7,5).

При приготуванні композиції Б, щоб запобігти утворенню осаду потрібно додати 6%-й розчин HCl, а після стерилізації та охолодження поживного середовища рН доводиться 6% розчином NaOH до оптимального значення (7,5±0,2).

Солі (Композиції Б) розчиняються в окремому збірнику, з якого потім вони будуть подані в посівний апарат, де проводиться стерилізація. Композиція А готується та стерилізується в окремому збірнику.

4.1.4.3. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 630 л

Середовище ділять на такі композиції:

Композиція А: Меляса (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція Б: FeSO₄, (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄ (режим стерилізації: 131 °C, 40 хв, рН 7,0-7,5).

Композиція А готується та стерилізується в окремому збірнику, тому що вона потребує більш м'який режим стерилізації.

Композиція Б стерилізується у ферментері разом, але для того щоб запобігти утворенню осаду потрібно додати 6%-й розчин HCl, а після стерилізації поживного середовища рН доводиться 6% розчином NaOH до оптимального значення (7,5±0,2).

4.1.5. Обґрунтування використання титруючі агентів та піногасника

4.1.5.1. Використання титруючі агентів

Оскільки при приготуванні сольових розчинів в одному збірнику фосфат заліза випадає в осад, то щоб запобігти цієї проблеми доцільно використовувати 6%-й розчин HCl, щоб знизити рН, та вирішити проблему. Після стерилізації та охолодження композиції рН необхідно довести лужним 6% розчином NaOH, до значення $7,5 \pm 0,2$.

Для того, щоб визначити спосіб приготування деяких компонентів середовища (меляса) і допоміжних розчинів (кислоти та лугу) і визначитися з необхідними для цього колбами чи збірниками, потрібно розрахувати кількість таких компонентів, необхідну для приготування середовища на кожен з трьох стадій виробництва (таблиця 2.3).

Таблиця 4.1.5.1.

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища

Об'єм середовища, л	Меляса		NaOH (6%)		HCl(6%)	
	Вміст, г	Особливості приготування	Об'єм, мл	Особливості приготування	Об'єм, мл	Особливості приготування
3	69	у колбі на 1 л × 5 колб	–	–	–	–
35	805	у колбі на 2 л	120	У колбі на 200 мл	120	У колбі на 200 мл
340	7820	у реакторі змішувачі 10 л	1200	У колбі на 1,5 л	1200	У колбі на 1,5 л

Підготовка і стерилізація титрувального агента NaOH для культивування в інокуляторі.

Для приготування 120 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 7,2 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 200 мл і за допомогою мірного циліндра на 250 мл додають 120 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення та закривають ватно-марлевою пробкою.

Приготований 6% розчин NaOH стерилізують гострою парою при температурі 131°C і тиску 0,15 протягом 45 хв. Не допускають контамінацію розчину.

Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH для культивування в ферментері.

Для приготування 1,2 л 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 72 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 1,5 л і за допомогою мірного циліндра на 2 л додають 1,2 л дистильованої води, перемішують до повного розчинення та закривають ватно-марлевою пробкою.

Приготований 6% розчин NaOH стерилізують гострою парою при температурі 131°C і тиску 0,15 протягом 45 хв. Не допускають контамінацію розчину.

Підготовка титрувального агенту HCl для культивування в інокуляторі.

Для приготування 120 мл 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 200 мл наливають за допомогою мірного циліндра на 250 мл – 112,8 мл дистильованої води і вносять за допомогою мірного циліндра на 10 мл при постійному перемішуванні 7,2 мл 31%-ого розчину HCl. Рідини обов'язково змішують у такому порядку, а не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції.

Підготовка титрувального агенту HCl для культивування в ферментері.

Для приготування 1,2 л 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 1,5 л наливають за допомогою мірного циліндра на 2 л – 1128 мл дистильованої води і вносять за допомогою мірного циліндра на 100 мл при постійному

перемішуванні 72 мл 31%-ого розчину HCl. Рідини обов'язково змішують у такому порядку, а не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції.

4.1.5.2. Використання піногасника

У складі поживного середовища в якості джерела вуглеводів використовується меляса. Але при аерації та змішуванні культуральної рідини, може утворюватися товстий шар піни, для запобігання цієї проблеми доцільно буде використовувати механічний спосіб піногасіння, його принцип полягає у встановленні мішалки у верхній частині апарата, яка по команді датчика обертається і розбиває піну.

Даний піногасник стерилізується разом з апаратом до якого він під'єднаний.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, що зображена на апаратурній схемі, наведена в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1.

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу біомаси *Bacillus subtilis* 1.1 для виробництва пробіотичного препарату

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика(Виробник)
1	2	3	4
P-1	Реактор-змішувач для приготування робочого розчину каустичної соди	1	Реактор змішувач об'ємом 1250 л, оснащений мішалкою до 200 об/хв; технологічним люком; вузлами наливу і зливу; рівнеміром; вакуумним насосом. Виробник: «ЕКАТО», Німеччина [32].
H-2 H-3 H-14 H-19 H-20 H-22	Насос перистальтичний	6	Перистальтичний насос МР-6, продуктивність 40-266 л/год. Виробник: Debet, Італія [33].

НУХТ БТЕК 04.01.7 КР ПЗ				
Зми.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Нагорна Т.С.		
Керівник		Старовойтова С.О.		
Н. контр.				
Консульт.				
Затверд.		Стадніков В.П.		
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання				
			Літ.	Арк.
				47
			77	
			47	
Кафедра БТМ				

ПЗ-4	Повітрозбірник	1	Повітрозбірник оснащений клапаном зливу конденсату. Матеріал: Сталь 3, 09Г2С Виробник: «Innovagroup», Україна [34].
Ф-5	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр G4. Рекомендований кінцевий перепад тиску 250 Па, Середня утримуюча здатність (A_m) синтетичного пилю (%) – $90 \leq A_m < 65$. Матеріал: целюлоза, голкопробивні неткані волокна, скло і мікроскловолокно. Виробник: «Alter Air», Україна [35].
К-6	Компресор	1	Компресор Matari M1100F75-3, потужність 1700 л/хв, максимальний робочий тиск 1 МПа. Виробник: «Matari», Японія [36].
ТО-7	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач WHE 2050, продуктивність 190 л/хв. Виробник: «Гідропневмосистеми», Україна [37].
РС-8	Ресивер	1	Ресивер серії РВ-300, об'єм 300 л, робочий тиск 1 МПа. Виробник: Укргазкомплект-2010,

			Україна [38].
ТН-9	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний повітрянагрівач АОВ-20. Напруга 220 В; продуктивність 3200 м ³ /год. Виробник: «Turbovent», Україна [39].
Ф-10	Головний фільтр очистки повітря	1	Фільтруючий матеріал ФМР ФВР ФТ-500-2-20-F5. Виготовлений з 100% поліестера вищої якості. Швидкість фільтрування 1,5 м/с [40].
Ф-11 Ф-12	Індивідуальний фільтр очистки повітря	2	Фільтруюче полотно ФПП-15-1,5. Опір потоку повітря 1,5 Па; поверхнева щільність 27г/м ² ; температура застосування до 70°С. E=99,9% [41].
Р-13	Реактор-змішувач для приготування розчину солей	1	Реактор – змішувач. Об'єм 40 л оснащений перемішуючою системою; холодильником зі змійовиком; двигуном; посудина для додавання сировини; приймальна посудина. Діапазон температур від -50 до 180°С. Виробник: «Steroglass», Італія [42].
І-15	Інокулятор	1	Біореактор об'ємом 60 л, оснащений: мішалки на нижній та верхній частинах апарату 10-600 об/хв, мембранний манометр,

			<p>мембранний датчик тиску, система перемішування, датчик рівня, датчик піни, розпилювач СІР, оглядове скло+світло, подача газів, температурний сенсор, датчик рН, датчик рО₂, порт для відбору проб, запасні порти, система контролю температури.</p> <p>Виробник: «Dci-biolafitte», США [43].</p>
Д-16	Об'ємно-ваговий дозатор	1	<p>Об'ємно-ваговий дозатор з нержавіючої сталі, діапазон зважування 100-1000 мл, продуктивність 10-18 раз/хв.</p> <p>Виробник: «Hualian», Китай [44].</p>
Р-17	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації м'яса	1	<p>Реактор – змішувач. Об'єм 30 л, оснащений перемішуючою системою; холодильником зі змійовиком; двигуном; посудина для додавання сировини; приймальна посудина. Діапазон температур від -50 до 180°C.</p> <p>Виробник: «Steroglass», Італія [42].</p>
Р-18	Реактор-змішувач для приготування розчину солей	1	<p>Реактор – змішувач. Об'єм 400 л, оснащений перемішуючою системою 24-30 об/хв; потужність приводу мішалки 2,2 кВт; оснащений рубашкою; температура робочої ємності</p>

			90°C. Матеріал - сталь AISI 316L. Виробник: «Технолог since 1993», Україна [45].
ФВ-21	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 630 л, оснащений: мішалки на верхній та нижній частині апарату 10-600 об/хв, мембранний манометр, мембранний датчик тиску, система перемішування, датчик рівня, датчик піни, розпилювач SIP, оглядове скло+світло, подача газів, температурний сенсор, датчик рН, датчик рО2, порт для відбору проб, запасні порти, система контролю температури. Матеріал санітарна сталь. Виробник «Sysbiotech», Австрія [26].

**РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ БІОМАСИ
BACILLUS SUBTILIS 1.1 ДЛЯ ОТРИМАННЯ ПРОБІОТИЧНОГО
ПРЕПАРАТУ**

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

ДР 1.1.1 Навчання та інструктаж

Перед тим як допустити персонал до роботи він проходить навчання та інструктаж. Інструктаж персоналу проводиться кожен рік. Під час навчання з персоналом детально обговорюють концепцію забезпечення якості продукції, підготовку та проведення технологічного процесу.

ДР 1.1.2 Санітарна підготовка персоналу

При влаштуванні на роботу та щорічно персонал, який безпосередньо зайнятий у виробництві мікробіологічних препаратів, повинен пройти медичний огляд, пройти систематичне навчання щодо санітарно-гігієнічних вимог, а також дотримуватися правил особистої гігієни.

Кожен працівник виробничого цеху повинен бути забезпечений чотирма комплектами санітарного одягу, заміна одягу проводиться щоденно і у міру забруднення. Працівники перед початком роботи повинні одягти чистий санітарний одяг, підібрати волосся під хустинку або ковпак, зняти з себе прикраси, змити лак з нігтів, ретельно вимити руки теплою водою з милом і продезінфікувати їх.

					НУХТ БТЕК 04.01.7 КР ПЗ			
<i>Зми.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Нагорна Т.С.</i>				РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу біомаси <i>Bacillus subtilis 1.1</i> для отримання пробіотичного препарату	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Старовойтова С.О.</i>						52	752
<i>Н. контр.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Консульт.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стадников В.П.</i>							

ДР 1.2. Підготовка дезінфікуючих розчинів

ДР 1.2.1. Приготування робочого розчину каустичної соди

Згідно розрахунків наведених у розділі 2, необхідно приготувати 1200 л розчину каустичної соди з концентрацією 2 %, для обробки усього обладнання, інвентарю та комунікацій. На технічних вагах зважують 1,7 кг діючої речовини та переносять її у реактор змішувач (Р-1) об'ємом 1250 л, за допомогою перистальтичного насосу (Н-2) додають 1198,3 л водопровідної води. Після додавання компонентів включають перемішуючий пристрій (100 об/хв) та нагрівають до температури 70-80°C, до повного розчинення речовини.

ДР 1.2.2. Приготування робочого розчину Аноліту ЕкоСвіту

У переносну емальовану ємність вносять 61,25 мл концентрату Аноліту, додають 12,25 л питної води та перемішують.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання

Прибирання приміщень проводиться за допомогою миючо-дезінфікуючого засобу Аноліт ЕкоСвіт (від ДР 1.2.2.) з концентрацією діючої речовини 0,05%. Під час щоденного прибирання миють підлогу і протирають зовні апаратуру. Ємність з миючим засобом змінюють кожні 30 м².

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

При генеральному прибиранні використовують 0,05% розчин Аноліту ЕкоСвіту (від ДР 1.2.2.). Генеральне прибирання проводять раз на місяці, під час нього миють двері, стіни та вікна. Після проведення прибирання проводять мікробіологічний контроль, вміст мікроорганізмів не повинен перевищувати 800 КУО/см².

ДР 1.4. Підготовка технологічного обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1. Миття обладнання

Миття обладнання проводять 2% розчином Каустичної соди (від ДР 1.2.1.). Робочий розчин зі збірника (Р-1) перистальтичним насосом (Н-3) подають на миття обладнання. Миття відбувається за допомогою СІР-мийки. Відпрацьований розчин йде на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 7.1)

ДР 1.4.2. Ополіскування обладнання

Ополіскування проводиться очищеною або пом'якшеною водою, з передачею води в збірник нейтралізації. Процес завершується ополіскуванням очищеною водою, протягом 5 хвилин, з повертанням води в збірник рециркуляційної води. Відпрацьована вода йде на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 7.1)

ДР 1.4.3. Технічний огляд

Після миття та ополіскування ємнісного обладнання проводять його технічний огляд з метою виявлення можливих не ущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. У разі їх знаходження проводять підтягування різьбових з'єднань.

ДР 1.4.4. Перевірка обладнання на герметичність

Для перевірки на герметичність на апараті закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря поки надлишковий тиск не складатиме $P=0,1-0,2$ МПа. Потім перекривають вентиль подачі повітря і фіксують покази манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Якщо падіння тиску не буде перевищувати 0,01 МПа, буде вважатися що апарат герметичний. В іншому випадку здійснюється пошук не ущільнень за допомогою галогенових течієпошукачів.

ДР 1.4.5. Стерилізація обладнання

Для стерилізації обладнання та комунікацій використовують стерилізацію водяною насиченою парою з тиском $P= 0,28-0,3$ МПа. Цей процес умовно поділяється на такі етапи: нагрівання апарата, стерилізація, охолодження.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрозбірник (ПЗ-4), на висоті 20-30 м, де концентрація мікроорганізмів стабілізована.

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення повітря.

Попередню очистку повітря здійснюють у фільтрі (Ф-5), що забезпечує очищення від 65 до 90%. При проходженні повітря через даний фільтр, пил,

механічні частки які мають діаметр 5-10 мкм затримуються, також знижується кількість контамінантів.

ДР 2.3. Компресування повітря

Стиснення повітря відбувається за допомогою компресора (К-6), при цьому утворюється тиск 1МПа, температура підвищується до 250°C, при цьому знищується значна кількість контамінуючої мікрофлори.

ДР 2.4. Охолодження повітря

Для видалення вологи яка утворилася при компресуванні, повітря піддають охолодженню у теплообмінному охолоджувачі (ТО-7) до температури 19°C, видалена волога передається в ресивер (РС-8), там відбувається видалення зайвої вологи до $W=60\%$.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

За для запобігання утворення конденсату пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, повітря нагрівають до температури 30°C у теплообміннику нагрівачі (ТН-9).

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря проходить через головний фільтр (Ф-10), в якому фільтруючим матеріалом є 100% поліестер вищої якості. Ступінь очищення складає 95 %.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед кожним апаратом встановлений індивідуальний фільтр (Ф-11, Ф-12) в якому фільтруючим матеріалом є фільтруюче полотно ФПП-15-1,5. Ступінь очищення 99,9%.

ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 3.1. Приготування і стерилізація титрувального агенту NaOH для культивування в інокуляторі

В підрозділі (4.5.1), було проведено розрахунок, і згідно нього для приготування поживного середовища в інокуляторі необхідно 120 мл 6% розчину NaOH. Для його приготування на технічних вагах зважують 7,2 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 200 мл і за

допомогою мірного циліндра на 250 мл додають 120 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення та закривають ватно-марлевою пробкою.

Приготований 6% розчин NaOH стерилізують в автоклаві при температурі 131°C і тиску 0,15 МПа протягом 45 хв. Не допускають контамінацію розчину.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація титрувального агенту NaOH для культивування в ферментері

В підрозділі (4.5.1), було проведено розрахунок, і згідно нього для приготування поживного середовища в ферментері необхідно 1,2 л 6%-го розчину NaOH. Для його приготування на технічних вагах зважують 72 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 1,5 л і за допомогою мірного циліндра на 2 л додають 1,2 л дистильованої води, перемішують до повного розчинення та закривають ватно-марлевою пробкою.

Приготований 6% розчин NaOH стерилізують в автоклаві при температурі 131°C і тиску 0,15 МПа протягом 45 хв. Не допускають контамінацію розчину.

ДР 3.3 Приготування титрувального агенту HCl для культивування в інокуляторі

В підрозділі (4.5.1), було проведено розрахунок, і згідно нього для приготування поживного середовища в ферментері необхідно 120 мл 6%-го розчину HCl. Для приготування у колбу об'ємом 200 мл наливають за допомогою мірного циліндра на 250 мл – 112,8 мл дистильованої води і вносять за допомогою мірного циліндра на 10 мл при постійному перемішуванні 7,2 мл 31%-ого розчину HCl. Рідини обов'язково змішують у такому порядку, а не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції.

ДР 3.4 Приготування титрувального агенту HCl для культивування в ферментері

В підрозділі (4.5.1), було проведено розрахунок, і згідно нього для приготування поживного середовища в ферментері необхідно 1,2 л 6%-го розчину HCl. Для його приготування у колбу об'ємом 1,5 л наливають за

допомогою мірного циліндра на 2 л – 1128 мл дистильованої води і вносять за допомогою мірного циліндра на 100 мл при постійному перемішуванні 72 мл 31%-ого розчину HCl. Рідини обов'язково змішують у такому порядку, а не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для колб

Для отримання посівного матеріалу в колбах на качалках необхідно приготувати 3 л поживного середовища. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведено у табл. 6.1.

Таблиця 6.1.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Меляса	23	69	А	1
Вода		1000 (мл)		
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,6	13,8	Б	1
FeSO ₄	2,0	6,0		
Вода		1000(мл)		
K ₂ HPO ₄	0,035	0,105	В	1
Вода		1000 (мл)		

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

У відтарований на технічних вагах лабораторний стаканчик об'ємом 1,5 л вносять 69 г меляси, мірним циліндром об'ємом 500 мл вносять 500 мл теплої водопровідної води, перемішують і переносять в колбу об'ємом 2 л, мірним циліндром об'ємом 500 мл доливають 500 мл водопровідної води,

перемішують, закривають колбу ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t=112^{\circ}\text{C}$ (30 хв).

ДР 4.1.2. Приготування та стерилізації композиції В

На технічних вагах зважують 13,8 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ і 6,0 г FeSO_4 . Наважки поміщають у колбу об'ємом 2 л, мірним циліндром об'ємом 1л додають 1 л водопровідної води, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t=131^{\circ}\text{C}$ (40 хв).

ДР 4.1.3. Приготування та стерилізації композиції В

На торсійних терезах зважують 0,105 г K_2HPO_4 . Наважку поміщають у колбу об'ємом 2 л, мірним циліндром об'ємом 1 л додають 1 л водопровідної води, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t=131^{\circ}\text{C}$ (40 хв).

ДР 4.1.4. Змішування композицій

Після стерилізації, композиції за асептичних умов зливають в стерильну колбу об'ємом 4 л та перемішують.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60 л.

Для отриманні посівного матеріалу в інокуляторі необхідно приготувати 35 л поживного середовища. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 60 л наведений в табл. 6.2.

Таблиця 6.2

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу інокуляторі об'ємом 60 л ($K_3=0,6$)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 35 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Меляса	23	805	А	1,3
Вода		500(мл)		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,6	161	Б	30,2

FeSO ₄	2,0	70		
K ₂ HPO ₄	0,035	1,2		
Вода		30,2		
Конденсат		3,5		3,5

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

У відтарований на технічних терезах лабораторний стаканчик об'ємом 1,5 л вносять 805 г меляси, до меляси мірним циліндром об'ємом 1 л вносять 250 мл теплої питної води, перемішують і переносять в колбу об'ємом 2 л, мірним циліндром об'ємом 250 мл доливають 250 мл водопровідної води, перемішують, закривають колбу ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t=112^{\circ}\text{C}$ (30 хв).

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізації композиції Б

На технічних вагах зважують 161 г (NH₄)₂SO₄, 70 г FeSO₄ і 1,2 г K₂HPO₄. Наважки переносять у реактор-змішувач (Р-13) об'ємом 40 л подають за допомогою лічильника 30,2 л водопровідної води (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації), також за для запобігання утворення осаду рН знижують до значення 4,5, 6% - вим розчином НСІ (від ДР 3.3), вмикають перемішувач до повного розчинення компонентів. Отриманий розчин перекачують перистальтичним насосом (Н-14) у попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 60 л (І-15), стерилізують у ньому при $t=131^{\circ}\text{C}$ (40 хв). Після стерилізації та охолодження, через додатковий порт, подається 6% розчин NaOH (від ДР 3.1), це робиться для того щоб рН довести до необхідного значення ($7,5\pm 0,2$).

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживних середовищ для отримання посівного матеріалу в ферментері об'ємом 630 л.

Для отриманні посівного матеріалу в ферментері необхідно приготувати 340 л поживного середовища. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в ферментері об'ємом 630 л наведений в табл. 6.3.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 630 л (Кз=0,6)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 340 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Меляса	23	7,82 (кг)	А	20
Вода		20		
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,6	1,564 (кг)	Б	286
FeSO ₄	2,0	680		
K ₂ HPO ₄	0,035	11,9		
Вода		286		
Конденсат		34		34

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-16) у реактор-змішувач (Р-17) об'ємом 30 л, переносять 7,82 кг меляси, та за допомогою лічильника подають 20 л водопровідної води, воду нагрівають до температури 30-40°C для кращого розчинення мелясу, перемішують та стерилізують у цьому ж реакторі при t=112°C (30 хв). Після стерилізації мелясу перекачують до ферментеру (ФВ-21) за допомогою перистальтичного насосу (Н-19).

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізації композиції Б

На технічних вагах зважують 1,564 кг (NH₄)₂SO₄, 680 г FeSO₄ і 11,9 г K₂HPO₄. Наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 400 л (Р-18) подають за допомогою лічильника 286 л водопровідної води (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації), вмикають перемішувач до повного розчинення компонентів. До отриманого розчину при перемішуванні додають 6% - й розчин HCl (від ДР 3.4), до рН 4,5, це робиться щоб запобігти утворенню осаду. Отриманий розчин перекачують перистальтичним насосом (Н-20) у попередньо простерилізований ферментер (ФВ-21), стерилізують у

ньому при $t=131^{\circ}\text{C}$ (40 хв). Після стерилізації та охолодження, через додатковий порт, подається 6% розчин NaOH (від ДР 3.2), це робиться для того щоб рН довести до необхідного значення ($7,5\pm 0,2$).

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Bacillus subtilis 1.1* зберігають у пробірці на щільному агаризованому поживному середовищі МПА, при температурі $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. пересіви проводять 1...2 рази на місяці. Всі роботи з культурою проводяться в строго асептичних умовах для запобігання контамінацій. Перед використанням колекційної культури (до ТП 5.2) проводять мікробіологічний контроль.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Культуру пересівають методом виснажу вального штриха на чашку Петрі з МПА для одержання ізолюваних колоній. Культивують в термостаті при температурі 30°C (48 год). Перед внесенням колоній (до ТП 5.3) проводять мікробіологічний контроль.

ТП 5.3. Вирощування інокуляту на агаризованому поживному середовищі

Отримані ізолювані колонії з чашки Петрі (від ТП 5.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним МПА (одна колонія використовується для однієї пробірки). В пробірки пересівають колонії які знаходяться на відстані не менше 1 см. Культивують в термостаті при температурі 37°C (24 год). Перед використанням культури (до ТП 5.4) проводять мікробіологічний контроль.

ТП 5.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

У пробірку з робочою культурою, вирощеною в пробірках зі скошеним агаром (від ТП 5.3), вносять 5 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Отриману бактеріальну суспензію пересівають у 5 колб місткістю 1 л з коефіцієнтом заповнення 0,6, в яких знаходиться по 0,6 л стерильного середовища (від ДР 4.1). Після цього колби закривають ватно-марлевими

пробками. Колбу поміщають у термостатовану мішалку, підтримують температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Посів витримують при зазначеній температурі протягом 36 годин. Після вирощування інокуляту здійснюють мікробіологічний контроль кожної колоби.

ТП 5.5. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 60 л

Асептично через конектор композицію А (від ДР 4.2.1) передають в інокулятор з розчином солей композиції Б (від ДР 4.2.2), та вмикають перемішувач. Через засівну колбу вносять 3 л посівного матеріалу (від ТП 5.4). Процес культивування відбувається при температурі 37°C при аерації $0,7 \text{ дм}^3 \text{ O}_2 / \text{дм}^3$ поживного середовища, протягом 36 год. Перед перенесенням посівного матеріалу, відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробничий біосинтез у ферментері $0,63 \text{ м}^3$

Виробниче культивування штаму *V.subtilis* здійснюється у ферментері об'ємом $0,63 \text{ м}^3$ (коефіцієнт заповнення – 0,6). Асептично через конектор композицію А (від ДР 4.3.1), передають у ферментер з розчином солей композиції Б (від ДР 4.3.2), та вмикають перемішувач. Через трубу перетискування перекачують інокулят з інокулятора (від ТП 5.5). Після внесення інокуляту культивування проходить за таких умов: температура 37°C , постійне перемішування відкритою турбінною мішалкою із частотою обертання 200 об/хв, аерація проводиться барботером (не менш як $0,7 \text{ м}^3 \text{ O}_2 / \text{м}^3$ середовища за 1 хв). Під час перемішування та аерації меляса може утворювати піну, щоб запобігти цей процес, на кришці ферментеру встановлена мішалка, яка призначена для механічного піногасіння. Біомасу контролюють за показником оптичної густини за довжини хвилі 540 нм, концентрацію живих клітин - за методом Коха, рівень спорутворення - мікроскопіюванням. Оптимальний час вирощування для кожної серії глибинних бактеріальних культур становить 36 год. Упродовж виробничого культивування періодично відбирають проби культуральної рідини для визначення кількості живих клітин

(КУО/см³). Під кінець культивування кількість КУО повинна становити не менше 10×10^9 КУО/см³.

ЗВ 7. Знешкодження відходів

Відпрацьовані робочі розчини мийно-дезінфікуючих засобів, воду після ополіскування обладнання та відпрацьоване повітря відправляють на знешкодження.

ЗВ 7.1. Знешкодження рідких відходів

Розчини мийно-дезінфікуючих засобів (від ДР 1.3.1 та ДР 1.3.2) а також вода отримана після ополіскування обладнання (від ДР 1.4.2) відправляють на водоочисні споруди.

ЗВ 7.2. Знешкодження газоподібних відходів

Відпрацьоване повітря з інокулятора (від ТП 5.5) та ферментеру (від ТП 6.1) йдуть на газоочисні споруди.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Мікробіологічний контроль

7.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Мікробіологічний контроль стерильності ПС здійснюють мікроскопуванням з подальшим висівом на чашки петрі з поживними середовищами МПА та СА.

Пробу простерилізованого поживного середовища відбирають в об'ємі, як правило, 50 мл і здійснюють прямим висівом на агаризовані середовища. Контроль здійснюють шляхом розсівання проби простерилізованого поживного середовища (або стерильної композиції поживного середовища перед змішуванням) на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем і подальшим інкубуванням.

Виконання посівів. Посіви здійснюють шляхом відбору 0,1 мл з об'єма проби стерильною піпеткою і нанесення її на поверхню СА – для виявлення грибів і дріжджів і МПА – для виявлення бактерій. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильної бактеріологічної петлі або стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами поміщають у термостат за температури 30...32 °С. Аналіз посівів здійснюють, починаючи з 6...8 години. На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів.

					НУХТ БТЕК 04.01.7 КР ПЗ			
<i>Зми.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Нагорна Т.С.</i>			<i>РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>		<i>Старовойтова С.О.</i>					<i>64</i>	<i>77</i>
<i>Н. контр.</i>						Кафедра БТМ ⁶⁴		
<i>Консульт.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						

7.1.2. Мікробіологічний контроль посівного матеріалу

Контроль посівного матеріалу проводять:

1. Методом мікроскопії - шляхом перегляду мазків, приготованих із суспензії розчиненого препарату та пофарбованих по Граму.

Для цього відібраний бактеріологічною петлею досліджуваний матеріал розподіляють тонким шаром по поверхні знежиреного предметного скла. Приготований мазок висушують на повітрі, після повного висихання фіксують. Після фіксації на фіксований мазок наливають один з основних барвників та залишають на 1-2 хв. Щоб уникнути осаду фарбують через фільтрувальний папір. Після пройденого часу фарбу зливають, акуратно видаляють фільтрувальний папір. Мазок заливають на 1-2 хв розчином Люголя до почорніння препарату. Потім розчин зливають, мазок пропліскують 96° етиловим спиртом або ацетоном, наливаючи і зливаючи його, поки мазок не знебарвиться і рідина, що стікає, не стане чистою (приблизно 20-40-60 секунд). Ретельно промивають скельця в проточній або дистильованій воді 1—2 хв.

Мікроскопіювання здійснюють з використанням оптичних мікроскопів. У досліджуваних мазках мають бути лише клітини *Bacillus subtilis*.

Під час мікроскопічного дослідження ми повинні побачити фіолетові, грам позитивні палички, овальної форми, із заокругленими кінцями. Довжина яких складає 2 – 3 мкм, а товщина 0,4 мкм. Вони можуть бути розміщені поодинокі або в невеликих ланцюжках. По всій поверхні клітини є джгутики [14].



Рисунок 7.1. Загальний вигляд бактерії *Bacillus subtilis* під мікроскопом

2. Мікробіологічним методом – шляхом посіву на МПА, та агаризоване середовище Сабуро.

При проведенні методу висівають по 0,5 мл культуральної рідини у пробірки (по 2 пробірки з поживним середовищем). Посівний матеріал розподіляють по всій поверхні поживного середовища погойдуючи пробірку. Посіви на МПА, агаризованому середовищі Сабуро інкубують при температурі 37°C (спочатку в горизонтальному положенні (протягом 2 діб), а потім - у вертикальному положенні. Результати посівів враховують через 48 годин, 72 години і через 8 діб. Посіви на агаризованому середовищі Сабуро інкубують при температурі $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 8 діб. Після інкубації посівів протягом вказаних термінів на поживному середовищі МПА не повинно виявлятися росту сторонніх мікроорганізмів, на твердому агаризованому середовищі Сабуро - росту грибів. У випадку виявлення у посівах сторонніх мікроорганізмів контроль повторюють на подвоєній кількості зразків препарату. При відсутності росту сторонніх мікроорганізмів при повторному висіві досліджувану культуральну рідину вважають відповідає вимогам. У випадку росту сторонніх мікроорганізмів при повторному висіві зразків, хоча б в одній пробірці, серію бракують.

7.2. Методика визначення показників росту і синтезу цільового продукту

7.2.1. Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси визначаємо за оптичною густиною клітинної суспензії із наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком.

Для цього у пробірці із 9 мл дистильованої води вносимо по 1 мл культуральної рідини. Збовтуємо суміш, переливаємо в кювети, та вимірюємо оптичну густина в спектрофотометрі за довжиною хвилі 540 нм, отримані дані перераховують за калібрувальним графіком [46].

7.2.2. Визначення кількості життєздатних клітин

Для визначення кількості життєздатних клітин у культуральній рідині можна використати метод Коха. Суть методу полягає у висіві певного об'єму досліджуваної суспензії на агаризоване середовище у чашки Петрі, з наступним підрахунком кількості колоній, що вирости .

Для аналізу в асептичних умовах відбирають 1 мл клітинної суспензії і поміщають у 9 мл стерильної водопровідної води, потім послідовно новою піпеткою переносять по 1 мл у ряд пробірок з 9 мл стерильної водопровідної води. Всього проводять 10 розведень.

З одержаних (попередньо ретельно перемішаних) розведень здійснюють висів у чашки Петрі, на поверхню середовища МПА для підрахунку бактеріальних клітин та середовища СА для підрахунку грибів та дріжджів. Висів здійснюють зазвичай по 0,05–0,1 мл, починаючи з найбільшого розведення. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні агаризованого середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Для кожного розведення використовують нову стерильну піпетку та новий стерильний шпатель. Чашки Петрі поміщають у термостат, і через 3–5 діб здійснюють підрахунок колоній.

Порахувавши кількість колоній і ступінь розведення, можна визначити кількість мікроорганізмів за формулою:

$$N = V \cdot (a \pm 2\sigma) \cdot K, \text{ де}$$

N – кількість мікроорганізмів в 1 мл суспензії;

K – розведення, з якого здійснено висів;

a – середня кількість колоній на чашці Петрі за розведення K ;

V – об'єм суспензії, взятий для посіву, мл; 2 – критерій при 9 % рівні значущості;

σ – середнє квадратичне відхилення, рівне $\pm \sum a / n$, n – кількість повторностей [47].

7.2.3. Визначення кількості спор

Кількість спор визначали методом фарбування спор за методикою Шеффера-Флутона. За допомогою даного методу можна розрізняти сплячі спори, спори, які піддаються активації, і спори, які проросли, але ще не показали розростання.

Для проведення аналізу необхідно відібрати невелику кількість суспензії, та на предметному склі зробити мазок діаметром близько 2,5 см. Зразок висушують на повітрі та фіксують над полум'ям газового пальника. Потім предметне скло покривають фільтрувальним папером або паперовою серветкою просоченою до насичення 0,5 %-вим барвником малахітового зеленого, та поміщають на 5 хвилин над водяною банею. Предметне скло промивають дистильованою водою, та додатково мазок фарбують сафраніном протягом 30 секунд. Потім знову промивають та підсушують мазок фільтрувальним папером. Під час мікроскопіювання можна побачити що, спори пофарбовані в зелений колір, а вегетативні клітини в червоно-коричневий [48].

7.2.4 Визначення пробіотичних властивостей

Для визначення антагоністичної активності пробіотичних мікроорганізмів використовують метод перпендикулярних штрихів. На дно чашки Петрі з агаризованим середовищем МПА бактеріологічною петлею наносять штрих бактерій *B. Subtilis* 1.1. Посіви інкубують за температури 37 °С упродовж 24 год. До культури, що виросла, підсівають тест-культури, попередньо вирощені

у м'ясо-пептонному бульйоні або іншому придатному поживному середовищі впродовж 18 год. Посів тест-культур здійснюють петлею у напрямку від зони росту молочнокислих бактерій (або будь-яких інших пробіотичних мікроорганізмів), не торкаючись її, та перпендикулярно до неї. Облік результатів проводять через 24 год інкубування за температури 37 °С за величиною зони відсутності росту тест-культур. Контролем росту тест-культур є їх паралельний посів на чашки з тим самим середовищем без досліджуваних культур [13].

7.2.5. Визначення концентрації джерела Карбону

Для культивування біологічного агента ми використовували напівсинтетичне поживне середовище, даного складу: меляса - 23 г/л, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4,6 г/л, K_2HPO_4 – 2,0 г/л, FeSO_4 – 0,035 г/л.

В даному поживному середовищі, джерелом вуглецевого живлення є меляса, а джерелом азотного живлення – сульфат амонію.

Кількість вуглеводів (сахароза, глюкоза, фруктоза), що входять до складу меляси визначають поляриметричним методом.

Цукри мають властивість обертати площину поляризованого променя світла, яке проходить через їхні розчини. Це зумовлюється наявністю в молекулах цукрів асиметричних атомів вуглецю. Оптична активність цукрів залежить від товщини шару розчину, їх концентрації та питомого обертання.

Визначення оптичної активності проводять за допомогою поляриметрів і цукромір. Головними робочими частинами поляриметра є: поляризатор (пристосування для поляризації світла), аналізатор (пристосування для визначення кута обертання площини поляризації) і поляризаційна трубка, яка заповнюється досліджуваним розчином і міститься між поляризатором і аналізатором.

Для проведення досліду, поляризаційну трубку заповнюють досліджуванним розчином, закривають скельцем і загвинчують гайкою (у трубці не повинно залишатися бульбашок повітря).

Дивлячись в окуляр зорової труби, встановлюють чітку видимість вертикальної лінії поворотом оправы зорової труби і лупи шкали. За допомогою рукоятки суміщають нуль ноніуса з нулем шкали і через окуляр зорової труби переконуються, що поле зору в поляриметрі при цьому рівномірно освітлене. Поляризаційну трубку з досліджуванним розчином вміщують у камеру поляриметра. За допомогою рукоятки знов установлюють рівномірне освітлення поля зору і роблять відлік по шкалі, користуючись ноніусом.

Якщо нуль ноніуса знаходиться між двома поділками шкали, то беруть менше ціле число. Потім праворуч від нуля ноніуса знаходять поділку, яка збігається з якою-небудь поділкою шкали. Це число дає десяті частки відліку по шкалі.

Визначають середнє з 3 – 4 значень. Помножуючи показники сахариметра на відповідні величини, визначають концентрацію цукру у 100 Мл досліджуваного розчину. За формулою визначення *концентрації* цукру обчислюють кут обертання площини поляризованого променя

$$C = \beta \times 100 / [\alpha] \times L, \text{ де}$$

C – концентрація цукру;

B – кут обертання поляризованого променя;

[α] — питоме обертання аналізованого цукру;

L — довжина трубки, Дм.

Питоме обертання [α] для цукрози +66,5, глюкози +52,80, фруктози -93 [49].

7.2.6. Визначення концентрації джерела Нітрогену

Джерелом нітрогену в даному поживному середовищі виступає сульфат амонію ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Для визначення концентрації джерела азоту необхідно розбавити супернатант культуральної рідини в співвідношенні 1:10 з дистильованою водою. Далі необхідно приготувати з робочого стандартного розчину NH_4Cl шкала розчинів з точно заданою концентрацією амонійного азоту, для чого попередньо скласти таблицю виходячи з умови, що 1 мл стандартного розчину містить 0,01 мг NH_3 . Для приготування розчинів в мірні колби внести зазначені в таблиці обсяги стандартного розчину і кожен обсяг шляхом розбавлення водою довести до 100 мл. На наступному етапі потрібно розвести 5 або 10 мл випробуваної рідини в мірній колбі до 100 мл. Додати в усі отримані стандартні і випробувані розчини по 0,5 мл сегнетової солі і по 1 мл реактиву Неслера. Визначення концентрації катіона амонію засноване на його реакції з реактивом Неслера з утворенням забарвленого в лужному середовищі в жовтий колір сполуки $\text{Hg}_2\text{O} \cdot \text{NH}_2$. Через 10 хв необхідно порівняти забарвлення випробуваного супернатанту з забарвленням стандартних розчинів. Концентрація амонійного азоту визначається за формулою

$$X = a \cdot n,$$

де X - концентрація амонійного азоту в випробуваної рідини, мг / л; a - концентрація амонійного азоту у відповідній колбі зі стандартним розчином, мг / л; n - ступінь розведення стічної рідини [50].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Пробиотик *Bacillus subtilis* у сучасній педіатрії: аргументи, факти, досвід, Автори: Завідувач кафедри педіатрії №1 Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, доктор медичних наук, професор С.Л. Няньковський 28.06.2019
2. Лактіале лінійка пробіотиків / Пробиотики необхідність чи мода?/[Електронний ресурс] // laktiale.ua– Режим доступу до сайту: <https://laktiale.ua/vse-pro-probiotiki/shho-take-probiotiki/probiotiki-neobhidnist-chi-moda/>
3. Швець О.В. Застосування пробіотиків у гастроентерологічній практиці // Сімейна медицина – 2012. – №6 – С. 20-24
4. Няньковський С.Л. Пробиотик *Bacillus subtilis* у сучасній педіатрії: аргументи, факти, досвід // Тематичний номер «Педіатрія» – 2019. – №2 – С.49
5. Нечипуренко О.О., Хархота М.А., Бордунос К.С., Авдєєва Л.В. Ріст і утворення каротинів штамми *Bacillus amyloliquefaciens* УКМ в-5113 та *Bacillus subtilis* 1.1 в умовах глибинного культивування // Мікробіол. Журн.-2015. – №2 – С. 41-48
6. Штанько Т. В. Біологічні властивості бацил та лактобактерій, перспективних для створення комплексного пробіотика: Автореф. дис. канд. біо. наук. Київ. – 2009. -23 с.
7. Пат.№ RU2132196С1 Спосіб одержання еубіотичного біоспорину/ И.А. Поберий, А.Т. Харечко, В.В. Кузнецов, В.А. Філін, А.Н. Доронін, В. В. Смирнов, І. Б. Сорокулова – Оуб. 27.06.1999
8. Хархота М.А., Осадчая А. И., Авдеева Л.В. Особенности роста пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* при совместном глубинном культивирован // Мікробіол. журн. - 2011. - Т. 73, № 6. – С. 25-31.

НУХТ БТЕК 04.01.7 КР ПЗ						
Зми. Арк.	№ докum.	Підпис	Дата			
Розрoд.	Нагорна Т.С.			СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ		
Керівник	Старовойтова С.О.					
Н. контр.						
Консульт						
Затверд.	Стадніков В.П.					
				Літ.	Арк.	Аркушів
					72	77
				72 Кафедра БТМ		

9. Мілян В. О., Хархота М. А., Нечипуренко О. О. Дослідження пробіотичних властивостей штамів *Bacillus sp.* 1.1. та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113// Мікробіол. Журн.-2014. – №5 – С. 15-22
10. Jeżewska-Fraćkowiak J., Seroczyńska K., Banaszczyk J., Jedrzejczak G., Żylicz-Stachula A., Skowron P.M. The promises and risks of probiotic *Bacillus* species. *Acta Biochim Pol.* 2018, 65(4): 509-519. doi: 10.18388/abp.2018-2652.
11. Савустяненко А. В. Механізми дії пробіотиків на основі *Bacillus subtilis* // Актуальна інсектологія – 2016.– №2 – С. 35-44
12. Школа доказової медицини – Механізми действия пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* // [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://shdm.school/sponsors/biopharma/2175-mehanizmy-dejstviya-probiotikov-na-osnove-Bacillus-subtilis>
13. Старовойтова С.О., Скроцька О.І., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П. Технологія пробіотиків: Підручник – К.:НУХТ, 2012. – 318с.
14. Большая советская энциклопедия [Електронний ресурс] // Slovar.cc – Режим доступу до сайту: <https://slovar.cc/enc/bse/2040317.html>
15. Хижняк О. С., Краснопольський Ю. М. Біотехнологічні аспекти отримання комплексного препарату, який містить різні штамми пробіотичних культур ISSN 2079.5459// Вісник НТУ «ХПІ». – 2013. – №4 – С. 113-120.
16. Елемент здоров'я – *Bacillus subtilis* протівірусні, антибактеріальні, імуномодельючі // [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://healthelement.com.ua/articles/infection-uk/bacillus-subtilis-protivirusni-antibakterialni-imunomodulyuyuchi>
17. Артамонова М. Н. Ризосферные бактерий *Bacillus subtilis* и их ростстимулирующее влияние на *Cucurbita pepo* L УДК 631.461:635.621 (043): Автореф. дис. канд. біо. наук. Ульяновск, 2017. 34с.
18. Rooney AP, Price NP, Ehrhardt C, Swezey JL, Bannan JD. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of

Bacillus subtilis subsp. inaquosorum subsp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2009 Oct;59(Pt 10):2429-36. doi: 10.1099/ij.s.0.009126-0. Epub 2009 Jul 21. PMID: 19622642.

19. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: підручник, 2-е вид., доп. і перероб. / Т.П. Пирог. – К. :НУХТ, 2010. – 632 с.
20. Немченко А.С., Міщенко В.І., Винник О.В., Тув А.Д. Аналіз особливостей розвитку ринку пробіотиків в світі та Україні Матеріали VII Міжнародної науково-технічної конференції «Актуальні проблеми розвитку галузевої економіки та логістики» (Харків, НФУ 15 листопада 2019 р.) С. 167-168.
21. Степанов Ю.М., Скирда І.Ю., Петішко О.П. Хвороби органів травлення — актуальна проблема клінічної медицини For cite: Gastroenterologia. 2019;53(1):1-6. doi: 10.22141/2308-2097.53.1.2019.163450
22. Лях В. Р., Червцова В. Г., Кричківська А. М. Пробиотики як сучасні превентивні препарати захворювань шлунково-кишкового тракту// Chemistry, Technology and Application of Substance. — Lviv Politechnic Publishing House 0,— 2018 – С. 72-77
23. Бактиспорин [Електронний ресурс] // Slovar.cc – Режим доступу до сайту: <https://www.likar.info/lekarstva/Baktisporin/>
24. Тімоніна М. Б. Державна служба статистики України Населення України за 2020 рік демографічний щорічник [Електронний ресурс] // ukrstat.gov.ua – Режим доступу до сайту: http://database.ukrcensus.gov.ua/PXWEB2007/ukr/publ_new1/2021/dem_2020.pdf
25. Патент 2130316 RU. Лечебно-профилактический биопрепарат "бактиспорин"/ Михайлова Н.А. , Кузнецова Т.Н. , Куныгина О.В. Опубл. 20.05.99.
26. Sysbiotech [Електронний ресурс] // en.sysbiotech.at – Режим доступу до сайту: <http://en.sysbiotech.at/industrial-scale-bioreactor-500-1000l/>

27. Ю.М. Пенчук Загальна біотехнологія [Електронний ресурс]: Конспект лекцій для студентів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної та заочної форм навчання / Ю.М. Пенчук. – К.: НУХТ, 2018. – 115 с.
28. Наказ МОЗ України «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів» від 14.12.2001 №502 // Режим доступу до сайту: https://zakononline.com.ua/documents/show/41907_487517
29. Наказ МОЗ України «Державний реєстр дезінфекційних засобів 2021 рік» // Режим доступу до сайту: https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%92%D1%96%D0%B4%D0%BA%D1%80%D0%B8%D1%82%D1%96%20%D0%B4%D0%B0%D0%BD%D1%96/2021/11/29/2021-%D1%80%D0%B5e%D1%81%D1%82%D1%80_%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1i%D0%B2_1-405.pdf
30. Циркуляционная мойка и дезинфекция оборудования [Електронний ресурс] // MSD.com.ua – Режим доступу до сайту: <https://msd.com.ua/pererabotka-mesel/cirkulyacionnaya-mojka-i-dezinfekciya-oborudovaniya/>
31. Основи проектування біотехнологічних виробництв: методичні рекомендації до виконання курсового проекту для студентів напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання. Київ: НУХТ, 2016. – 87 с.
32. ЕКАТО [Електронний ресурс] // ekato.com – Режим доступу до сайту: <https://www.ekato.com/products/process-plants-and-units/vacuum-processing-units-unimix/>
33. ДЕВЕМ [Електронний ресурс] // debem.com.ua – Режим доступу до сайту: https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-6/

34. Innovagroup [Електронний ресурс] // innovagroup.com.ua – Режим доступу до сайту: <https://innovagroup.com.ua/uk/povitrozbirniki/#1511450813682-6345e6ab-98d6>
35. Alter Air інженерні системи [Електронний ресурс] // shop.alterair.ua – Режим доступу до сайту: <https://shop.alterair.ua/product/vozdushnyye-panelnyye-filtry-gruboy-ochistki-g1-g4/#scrollDescription>
36. STORGOM [Електронний ресурс] // storgom.ua – Режим доступу до сайту: <https://storgom.ua/ua/product/kompressor-matari-m1100f75-3.html>
37. PASKAL Hydraulic & Pneumatic [Електронний ресурс] // paskal.ua – Режим доступу до сайту: https://paskal.ua/ua/product/teploobmenik-whe-2050_172.html
38. Укргазкомплект-2010 [Електронний ресурс] // ukr-gaz.com – Режим доступу до сайту: <https://ukr-gaz.com/ua/p1434123393-resiver-vozduhosbornik-300.html>
39. TURBOVENT AIR SYSTEMS [Електронний ресурс] // turbovent.com.ua – Режим доступу до сайту: <https://turbovent.com.ua/ua/p196580735-vodyanoj-kalorifer-vozduhonagrevatel.html>
40. ЭлВент [Електронний ресурс] // el-vent.ru – Режим доступу до сайту: <https://www.el-vent.ru/catalog/filtryushchiy-material-fmr-fvr-ft-500-2-20-f5/>
41. БРОМ [Електронний ресурс] // brom.ua – Режим доступу до сайту: <https://brom.ua/uk/filtrpoltno-petrianova-ukr>
42. Диам сучасна лабораторія [Електронний ресурс] // dia-m.ru – Режим доступу до сайту: <https://www.dia-m.ru/catalog/lab/reaktory-khimicheskie/reaktory-parallelnogo-sinteza/reaktor-khimicheskij-farmatsevticheskij-20-1/>
43. DCI-BIOLAFITTE [Електронний ресурс] // dci-bio.com – Режим доступу до сайту <http://www.dci-bio.com/products/bioreactors/biocell-pilot-series-bioreactors/>
44. Цикада [Електронний ресурс] // cicada.in.ua – Режим доступу до сайту: <https://cicada.in.ua/dozator-ob'yemnij-dlya-v'yazkih-ridin-gcg-a-1000-hualian>

- 45.Технолог since 1993 [Електронний ресурс] // tehnolog.com.ua– Режим доступу до сайту: <https://tehnolog.com.ua/catalog/pharma/mixers-for-liquid-viscous-and-paste-like-products/>
- 46.Егоров Н.С. Биотехнология: проблемы и перспективы. – М.: Высшая школа, 1997. – 282 с
- 47.Загальна мікробіологія і вірусологія: лабораторний практикум для студ. освітнього ступеня «Бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми навч. / уклад. Т.П. Пирог, М.М. Антонюк. – К.: НУХТ, 2016. – 126 с.
- 48.Mormak DA, Casida LE. Study of Bacillus subtilis Endospores in Soil by Use of a Modified Endospore Stain. Appl Environ Microbiol. 1985;49(6):1356-1360. doi:10.1128/aem.49.6.1356-1360.1985
- 49.1SNAU.ru / Методи визначення масової частки вуглеводів / [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://1snau.ru/metodi-viznachennya-masovo%D1%97-chastki-vuglevodiv-2/>
- 50.Визначення амонійного азоту [Електронний ресурс] // um.co.ua– Режим доступу до сайту: <http://um.co.ua/1/1-1/1-16764.html>