

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра Біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан
факультету)

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри

_____ Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (прізвище та ініціали)

_____ Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » червня 2022р.

« » червня 2022р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми Біотехнології: фармацевтична, промислова,
харчова, природоохоронна

на тему: Культивування *Bifidobacterium adolescentis* для виробництва
пробіотичного препарату

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 2

БОНДАРЧУК Анастасія Вадимівна

_____ (прізвище, ім'я, по батькові повністю)

_____ (підпис)

Керівник СТАРОВОЙТОВА Світлана Олександрівна

_____ (прізвище, ім'я та по батькові повністю)

_____ (підпис)

Консультанти _____

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Рецензент _____

Оксана НИЧИК

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Я як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____

_____ (підпис)

Київ - 2022р.

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

Бондарчук Анастасії Вадимівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Культивування *Bifidobacterium adolescentis* для
виробництва пробіотичного препарату»

керівник роботи Старовойтова Світлана Олександрівна доц., канд.б.наук,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

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

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи Продуцент – *Bifidobacterium adolescentis*,
Цільовий продукт – моноштамовий пробіотик на основі біомаси
продуцента.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1.
Характеристика цільового продукту біосинтезу. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору
біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4.
Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва пробіотика «Біфідин» - 1 аркуш формату А1.
Анотатурна схема виробництва «Біфідин».

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	<i>Характеристика цільового продукту біосинтезу</i>	<i>4.04.22-15.04.22</i>	
2	<i>Обґрунтування вибору біологічного агента</i>	<i>15.04.22-20.04.22</i>	
3	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>21.04.22-30.04.22</i>	
4	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>	<i>30.04.22-05.05.22</i>	
5	<i>Специфікація обладнання</i>	<i>10.05.22-12.05.22</i>	
6	<i>Опис технологічної схеми</i>	<i>12.05.22-15.05.22</i>	
7	<i>Контроль виробництва</i>	<i>16.05.22-20.05.22</i>	
8	<i>Оформлення пояснювальної записки</i>	<i>21.05.22-25.05.22</i>	
9	<i>Виконання графічної частини проекту</i>	<i>05.05.22-10.05.22</i>	

Здобувач

_____ (підпис)

Анастасія БОНДАРЧУК

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Світлана СТАРОВОЙТОВА

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячений розробленню технологічної схеми одержання пробіотика з бактеріальної маси *Bifidobacterium adolescentis* МС-42, який, за оптимальних умов росту на порівняно найдешевшому середовищі, синтезує найбільшу кількість живих клітин за 18 годин - $1 \cdot 10^{10}$ КУО/мл та накопичує в клітинах та культуральній рідині цінні продукти життєдіяльності, що зумовлюють кращу дію препарату. Розрахована потужність виробництва препарату становить $0,13 \text{ м}^3$ культуральної рідини за цикл ферментації. Технологічний процес складається з допоміжних (підготовка інертного газу, приготування і стерилізація титрувальних агентів та поживних середовищ) та основних робіт (вирощування інокуляту у спеціальних флаконах для анаеробів та посівних апаратах об'ємами 5 л, 60 л, а також виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 200 л з коефіцієнтом заповнення 0,7).

Новизною дипломного проекту є реалізація виробництва пробіотика на основі штаму *Bifidobacterium adolescentis* МС-42, який здатний нарощувати біомасу з високою концентрацією живих біфідобактерій ($1 \cdot 10^{10}$) на дешевих поживних середовищах та є набагато ефективнішим за препарат-аналог «Біфідумбактерин», оскільки містить продукти життєдіяльності, що виконують додаткові необхідні для лікування функції.

Дипломний проект викладений на 64 сторінок друкованого тексту, містить 16 таблиць та 2 рисунки. Складається з вступу, семи розділів, висновку та списку використаної літератури (46 джерел) та графічної частини (2 креслення формату А1).

Ключові слова: *Bifidobacterium adolescentis* МС-42, пробіотичний препарат, біомаса, молочна кислота, поживне середовище, біфідин, *Bifidobacterium*, біосинтез пробіотика.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1.ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ	7
РОЗДІЛ 2.ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	10
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	10
2.2. . Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	19
2.3. Таксономічний статус біологічного агента	20
РОЗДІЛ 3.ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	20
3.1 Визначення потреби у пробіотику на основі біомаси <i>Bifidobacterium adolescentis</i> МС-42	20
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	22
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера	25
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.	29
РОЗДІЛ 4.ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	29
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	29
4.1.1. Обґрунтування способу культивування та типу ферментера	29
4.1.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря	32
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	33
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	41
РОЗДІЛ 5.СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	44
РОЗДІЛ 6.ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	46
РОЗДІЛ 7.КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	55
7.1. Мікробіологічний контроль.....	55
7.1.1. Мікробіологічний контроль чистоти культури	55
7.1.2. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища	56
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	56
7.2.1. Визначення концентрації живих клітин.....	56
7.2.2 Визначення концентрації джерел вуглецю та азоту.....	60
ВИСНОВКИ	60
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	61

ВСТУП

Виробництво пробіотиків та функціональних продуктів харчування збагачених пробіотичними мікроорганізмами є вкрай необхідним для людини в наш час. Велика кількість факторів: стреси, несприятлива екологічна ситуація, неконтрольоване вживання лікарських хіміотерапевтичних препаратів – негативно впливають на мікрофлору органів шлунково-кишкового тракту. Для лікування та профілактики дисбіозів і їх наслідків використовують пробіотичні препарати.

Сьогодні створюються штами пробіотичних мікроорганізмів, які мають протипухлинну, імуномодельюючу, антимікробну та антивірусну властивості. І використовують відповідно в різних сферах медицини.

Найпоширенішими і провіреними часом є пробіотики, які складаються з біомаси біфідобактерій. Вони є компонентами домінантної мікрофлори, яка виконує регуляторну функцію, протидіє заселенню біотопу випадковими мікроорганізмами, бере участь у процесах ферментації та імуностимуляції [1]. Найтипівішим препаратом-представником на основі біфідобактерій є «Біфідумбактерин», що складається з одного штаму біфідобактерій *Bifidobacterium bifidum №1* [2]. Але проблемою є те, що біфідобактерії, так само як і лактобацили – дуже вимогливі до поживних середовищ та умов культивування. Вони потребують додаткових факторів росту: вітамінів, амінокислот, пуринів та пірамідинів [3]. Це робить їх культивування дещо складнішим і дорожчим, що позначається на ціні продукта.

Тож, метою було створити препарат, що продукує більшу кількість живої біомаси за коротшу кількість часу на дешевшому поживному середовищі. Дані умови зробили б більш доступним даний пробіотик для населення.

Створено високоефективний моноштамовий пробіотик на основі біомаси біфідобактерій «Біфідин» [4]. Його з успіхом застосовували для лікування гострих інфекційних хвороб органів ШКТ.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.08 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>ВСТУП</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркцш</i>	<i>Аркцшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Бандарчик А.В.</i>							
<i>Керівник</i>	<i>Старовойтова С.О.</i>						4	64
<i>Н. конт</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

А також він відзначився здатністю нарощувати біомасу з високою концентрацією живих біфідобактерій ($1 \cdot 10^{10}$) на дешевих поживних середовищах та накопичувати продукти життєдіяльності, які позитивно впливають на шлунково-кишковий тракт [4] .

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ

Пробіотики – медичні імунобіологічні препарати на основі живих мікроорганізмів та речовин мікробного походження, які за природного способу введення зумовлюють позитивні ефекти на фізіологічні, біохімічні та імунні реакції організму хазяїна (людини або тварини) внаслідок оптимізації або стабілізації його мікробіоти. Основною сферою застосування пробіотиків є медицина. Як ліки ці препарати використовують при дисбіозах. Також, лікарі їх призначають при ожиріннях, послабленні імунної системи, алергіях, астмі, мастопатіях, стоматитах, алкоголізмі, циститі, цукровому діабеті, ревматоїдному артриті та навіть при психічних розладах (гіперактивність, розлади уваги) тощо. Можна зробити висновок, що пробіотики є поліфункціональними препаратами [1].

Пробіотики на основі біфідобактерій є досить популярними та ефективними, зокрема на основі *Bifidobacterium adolescentis* (табл. 1.1), оскільки цей вид входить до складу облігатної мікрофлори, яка є ключовою складовою мікробіоценозу. Біфідобактерії володіють високою безпекою та

мають статус GRAS (Generally Regarded As Safe – загально визнаний як безпечний) в Управлінні з контролю якості харчових продуктів і лікарських препаратів - FDA.

В даному випадку цільовим продуктом є моноштамовий пробіотик Біфідин [4]. За анатомо-терапевтично-хімічною класифікацією (АТС-класифікація) Біфідин належить до протидіарейних мікробних препаратів (A07FA10).

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.08 КР ПЗ</i>		
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробник</i>	<i>Бандарчик А.В.</i>				<i>Розділ 1</i>		
<i>Керівник</i>	<i>Старовойтова С.О.</i>						
<i>Н. контр</i>					<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Консульт</i>						6	64
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		

СПЕЦИФІКАЦІЯ
БІФІДИН

Показники контролю	Встановлені значення	Методи контролю
Опис	порошок бежевого кольору різної інтенсивності зі специфічним смаком і запахом;	За п. 1. АНД візуально
Автентичність	Грампозитивні, не рухливі, поліморфні палички, з біфуркаціями на кінцях, завдовжки 4-5 мкм, розміщуються у вигляді скупчень або окремих клітин. Облігатні анаероби. При рості на напіврідких середовищах для біфідобактерій мають форму дрібних «цвяхів», «крихток», «ниток» білого кольору. Під час струшування утворюють крихко подібну масу	За п. 2. АНД бактеріологічно, бактеріоскопічно
Розчинність	У разі додавання води (1 мл на 1 дозу препарату) протягом 5 хвилин утворюється гомогенна суспензія сіривато-бежевого кольору	За п. 3. АНД візуально
Прозорість	Суспензія не має бути прозорою	За п.4. АНД візуально
Кольоровість	Суспензія має бути сіро-бежевого або	За п.5. АНД

	бежевого кольору	візуально
Специфічна активність:	В одній дозі препарату міститься не менше ніж 10^9 КУО/мл (до 10^{11} КУО/мл) живих біфідобактерій.	За п. 10.1 АНД
Визначення живих біфідобактерій в одній дозі препарату	Антагоністична активність до тест-культур <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp</i> , <i>Shigella sp</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter spp</i> , <i>Candida albicans</i> .	За п.10.2 АНД
Визначення антагоністичної активності		

Сфера застосування. Препарат використовується в медицині для лікування гострих інфекційних кишкових захворювань та дисбіозів.

Препарат створювали як вдосконалений аналог Біфідумбактерину (*B. bifidum*).

Особливістю біопрепарата-пробіотика є те, що окрім біомаси біфідобактерій він містить їх продукти життєдіяльності (волютин, білково-полісахаридний комплекс, лужна протеаза та декстринази), які справляють виражений бактеріогенний ефект. Це сприяє високій інтенсивності процесів метаболізму, внаслідок цього кращому захисту організму, в тому числі і від патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. До того ж, штам, використаний для приготування цього пробіотика (*Bifidobacterium adolescentis* МС-42) продукує специфічні ферменти: арабінофураногідролазу, α -галактозу, протеїназу, відповідальні за важливі фізіолого-біологічні процеси в травному тракті [4].

Переваги перед Біфідобактерином: висока клінічна ефективність (зникнення інтоксикації та болі у животі, нормалізація стулу протягом 3-х діб) при лікуванні гострих кишкових захворювань. Сануюча активність до патогенних бактерій, в тому числі і сальмонел. Має більш виражену анатагоністичну активність до клінічних

штамів стафілококів, ентерококів, стрептококів, шигел, сальмонел та грибів роду *Candida* . Спричиняє загибель збудників, резистентних до антибіотиків.

Підсумувавши все, можна зробити висновок, що даний пробіотик є актуальним та ефективним препаратом, тому необхідно розробити і вдосконалити схему його одержання.

РОЗДІЛ 2

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Біфідобактерії відіграють важливу роль, як представники мікрофлори людини, а також переважають за чисельністю у біоплівці ще із самого народження. Їх біомаса є цінним матеріалом в лікуванні та профілактики різноманітних розладів травлення, але й доволі дорогим [1]. Це стало поштовхом до вивчення проблеми і розробки дешевших і простіших поживних середовищ, на яких можна отримати великий вихід біомаси.

Деякі штами виду *Bifidobacterium adolescentis* мають особливу пробіотичну активність та властивості:

- *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15706 – є продуцентом фолієвої кислоти [5];
- *Bifidobacterium adolescentis*-С 52 – проявляє протеолітичні властивості [6];
- *Bifidobacterium adolescentis* 79-84 – має антимікробні властивості [7];
- *Bifidobacterium adolescentis* P2P3 – проявляє імуномодулюючу дію [8];
- *Bifidobacterium adolescentis* МС-42 – має адгезивні властивості, а також цей штам продукує лектини [9], тобто, також його можна вважати імуномодулятором.

В таблиці 2.1 порівняно ці штами за складом поживного середовища, концентрацією біомаси та складністю умов культивування, що було практично та теоретично обґрунтовано у відповідних статтях, патентах, дисертаціях.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.08 КР ПЗ</i>					
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Розділ 2</i> <i>Обґрунтування вибору</i> <i>біологічного агента</i>					
<i>Розробник</i>	<i>Бондарчук А.В.</i>							<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Старовойтова С.О.</i>								9	64
<i>Н. контр</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консульт</i>										
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>									

Особливості одержання концентрації живих клітин різних штамів *Bifidobacterium adolescentis*

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Тривалість культивуванн, год	Концентрація живих клітин, КУО/мл	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	Концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> МС-42	Гідролізат казеїну	1,5	18	$1 \cdot 10^{10}$	t = 37 °С анаеробні умови	Пат RU 2287572 С2. Питательная среда для культивирования Бифидо-и Лактобактерий/Марьин В.А., Райдна Е.И.- Опубл. 20.11.2006
	Дріжджовий автолізат	2,5				
	Молочна сироватка (склад з 15 % сухих речовин з гідролізовною на 70% лактозою)	3,5				
	Натрій фосфорнокислий двозаміщений 12-водний	0,1				
	Молоко знежирене	2,4				

<i>Bifidobacterium adolescentis</i> P2P3	Подрібнені м'ясні гранули підшлункової залози,	0,102	48	–	t = 37 °C анаеробні умови	Jung DH, Kim GY, Kim IY, Seo DH, Nam YD, Kang H, Song Y, Park CS. <i>Bifidobacterium adolescentis</i> P2P3, a Human Gut Bacterium Having Strong Non-Gelatinized Resistant Starch-Degrading Activity// J MicrobiolBiotechnol – 2019. – Vol.28, 29, № 12. – P. 1904-1915. DOI: 10.4014/jmb.1909.09010. PMID: 31635446.
	казеїн ,	0,3				
	дріжджовий екстракт ,	0,05				
	фосфату калію,	0,05				
	L- цистеїн	0,005				
	резазурин ,	0,01				
	вітамін К ₁ ,	0,01				
	нітрилотріоцтова кислота ,	0,0015				
	MgSO ₄ · 7H ₂ O,	0,003				
	MnSO ₄ ,	0,0005				
	NaCl,	0,001				
	FeSO ₄ · 7H ₂ O,	0,0001				
	CoSO ₄ · 7H ₂ O,	0,00018				
	CaCl ₂ · 2H ₂ O ,	0,000001				
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O,	0,00018				
	CuSO ₄ · 5H ₂ O,	0,000001				
	KAl (SO ₄) ₂ · 12H ₂ O ,	0,000002				
H ₃ BO ₃ ,	0,000001					

	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Біотин, фолієва кислота, піридоксин- HCl, тіамін-HCl · $2\text{H}_2\text{O}$, рибофлавін, нікотинова кислота, D-пантотенова кислота , вітамін B ₁₂ 4- амінобензойна кислота ліпоєва кислота	0,000001 0,0000025 0,002 0,002 0,01 0,005 0,005 0,005 0,005 0,005 0,001 0,005 0,005				
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> 79-84	Пептон Хлорид натрію Агар-Агар Лактоза	2 5 0,75 10	48	$9,8 \cdot 10^{10}$	t = 37 °C анаеробні умови	Пат. RU 2451735 C2. Штам <i>Bifidobacterium adolescentis</i> 79-84, используемый для

	Цистеїн солянокислий Гідролізат молока	0,1 980 мл				получения бифидосодержащей продукции/Левченко Т. О., Ляная А.М. - Оpubл. 27.05.2012 Пат. RU2158302C2 Питательная среда для роста бифидо- и лактобактерий / Р.С. Рахманов
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15706	Агар мікробіологічн ий Панкреатичний гідролізат казеїну Екстракт пекарських дріжджів Глюкоза	0,75 30 5 7,5	48	$2 \cdot 10^8$	t = 37 °C анаеробні умови	Домотенко Л. В., Шепелин А.П. Бифидум- среда для выделения и культивирования бифидобактерий // Инфекция и иммунитет. - 2014.–Т.4, №3. – С. 279 – 283.

	Лактоза	2,5				
	Цистеїн	0,5				
	Хлорид натрію	2,5				
	Магній					
	сірчаноокислий	0,5				
	7-водний					
	Кислота	0,5				
	аскорбінова					
	Натрій	0,3				
	оцтовоокислий					
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> - С 52	Соева сироватка	6%	24	$9 \cdot 10^9$	t = 37 °С рН = 7,0 анаеробні умови	Крупицька Л. О. Розробка технології симбіотичних біологічно активних добавок: Дис. канд. Тех. Наук. Одеса. – 2018. – С. 257(с. 64, 72, 76).
	Суха лактоза	10				
	Пептон	10				
	Аскорбінова кислота	0,5				
	Лимоннокислий натрій	6				
	тризаміщений					
	Фосфорнокислий калій	2				
	однозаміщений					
	Сірчаноокислий магній	1				
	Агар-агар	2,5				

Згідно даних табл. 2.1.1 найбільше продукує біомаси *Bifidobacterium adolescentis* 79-84, але тривалість культивування в порівнянні зі штамом *Bifidobacterium adolescentis* МС-42 довша на 30 год.

Також наведена характеристика технологічного процесу (див. табл. 2.1.1), є недостатньою. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента порівнювали вартість поживних середовищ, використовуваних для культивування штамів з найбільшим виходом біомаси – *Bifidobacterium adolescentis* МС-42, *Bifidobacterium adolescentis*-С 52 та *Bifidobacterium adolescentis* 79-84 (табл. 2.2.).

Таблиця 2.1.2

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів біомаси

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонент, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
1	2	3	4	5	6
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> МС-42	Гідролізат казеїну	1,5	2160	3,2	1
	Дріжджовий автолізат	2,5	1632	4	1
	Молочна сироватка (склад з 15 % сухих речовин з гідролізовною на 70% лактозою)	3,5	25	0,8	2
	Натрій фосфорнокислий двозаміщений 12-водний	0,1	47, 10	0,005	3
	Молоко знежирене	2,4	75	0,18	4
	Вартість 1 л середовища – 8,18 грн				
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> 79-84	Пептон	2	750	1,5	3
	Хлорид натрію	5	4,90	0,025	5
	Агар-Агар	0,75	420	0,3	6
	Лактоза	10	54, 60	0,546	3

	Цистеїн солянокислий	0,1	650	0,065	7
	Гідролізат молока	980 мл	360	352	8
	Вартість 1 л середовища – 355 грн				
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> -С 52	Соєва сироватка	30	161	4,83	9
	Суша лактоза	10	54, 60	0, 546	3
	Пептон	10	750	7,5	3
	Аскорбінова кислота	0,5	370	0,185	9
	Лимоннокислий натрій тризаміщений	6	40, 20	0,2412	3
	Фосфорнокислий калій однозаміщений	2	52, 80	0,1056	3
	Сірчанокислий магній	1	10, 80	0,0108	3
	Агар-агар	2,5	420	1,05	6
	Вартість 1 л середовища – 15 грн				

Примітка* – Ціни наведено станом на січень 2021р. 1- <http://agar.com.ua/>, 2 - <https://flagma.ua/uk/>, 3 - <https://www.systopt.com.ua/>, 4 - <https://agrobiz.net/>, 5 - <https://klebrig.com.ua/ua/>, 6 - <https://flagma.ua/uk/>, 7 - <https://him-element.com.ua/>, 8 - <https://prom.ua/ua/>, 9 - <https://him-component.com.ua/ua/>

Для створення таблиці 2.1.2 була порівняна вартість трьох різних поживних середовищ (грн/л) для відповідних пробіотичних мікроорганізмів.

Показники таблиць 2.1.1 і 2.1.2 вказують, що найбільш економічно вигідним для культивування є саме штам *Bifidobacterium adolescentis* МС-42, враховуючи ціну поживного середовища, необхідного для виходу даної кількості біомаси та мінімальну тривалість культивування.

В таблиці 2.1.3 був проведений підрахунок вартості орієнтованої концентрації біомаси (приймаємо 6 г/л), як показника процесу.

Таблиця 2.1.3

Умовна вартість біомаси, синтезованої на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Концентрація біомаси г/л	Тривалість культивування, год	Кількість біомаси, утвореної за годину, г/л	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> MC-42	6	18	0,3	8,18	1,5
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> 79-84	6	48	0,13	355	59
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> - C 52	6	48	0,13	15	2,5

Отже, таблиця 2.1.3 допомогла підсумувати данні та підтвердити, що *Bifidobacterium adolescentis* MC-42 є найкращим біологічним агентом. На це вказує просте та дешеве поживне середовище (8,18 грн/л), найнижча умовна вартість цільового продукту (1,5 грн/г) та найбільший вихід біомаси за годину (0,3 г/л).

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

Вид *Bifidobacterium adolescentis* представлений грампозитивними паличками (рис 3.1), які на кінцях роздвоюються, потовщуються або гілкуються, не утворюють спор та капсул. Не містять цитохромів та каталази. При культивуванні біфідобактерій у молоці чи печінковому бульйоні розгалуження зникає, клітини стають грамваріабельними, не чітко фарбуються, з'являється багато гранульованих форм, які схожі на коки. На агаризованих середовищах утворюють колонії у вигляді дисків (3 мм) або S-форми білого або світло-бежевого кольору, а в рідких поживних середовищах – ростуть по всій висоті, якщо забезпечені анаеробні умови. Здатні тільки до бродіння. Не можуть жити в повітрі і гинуть під дією антисептиків та деззасобів [11]

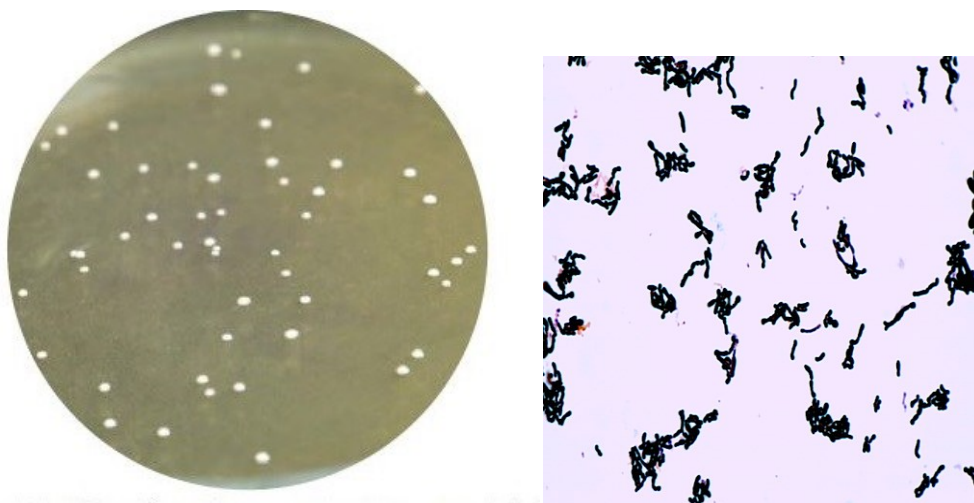


Рис. 5.1. Культура *Bifidobacterium adolescentis* MC-42:

a – колонії на агаризованому середовищі; *б* – біомаса під мікроскопом (90×)

Bifidobacterium adolescentis MC-42 – облигатний анаероб. Це є кислостійкий (не росте при $\text{pH} < 4,5$ чи $> 8,5$), нерухомий, непатогенний, мезофільний (20°C - 45°C , оптимум 38°C) мікроорганізм. Бактерії цього виду за типом живлення є хемоорганогетеротрофами [12, 13]. Ростуть на м'ясо-пептонних, цукрових середовищах і потребують додавання вітамінів та факторів росту (біотину, рибофлавіну, пантотенової кислоти, пуринових і піримідинових основ, пептидів, цистеїну, аміноцукрів) у великих кількостях [12]. Вони здатні синтезувати оцтову і молочну кислоту. Саме тому поживне середовище для їх культивування має бути забуферним. Виділити цей мікроорганізм із ґрунту, водойм, повітря неможливо

оскільки місцем його перебування може бути тільки кишківник та слизові оболонки людини [3]. До того ж проявляє антагоністичну активність по відношенню до *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Shigella sp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp*, *Candida albicans* в рази більшу ніж *Bifidobacterium bifidum* [4]. Здатність до розрідження желатину, газоутворююча та каталазоутворююча властивості відсутні [14].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Таксономічний статус *Bifidobacterium adolescentis* MC-42 наведено згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій, де використовується філогенетична систематика, яка є актуальною досі [3].

Bifidobacterium adolescentis

Домен - *Bacteria*

Відділ – *Actinobacteria*

Клас – *Actinobacteria*

Родина – *Bifidobacteriaceae*

Рід – *Bifidobacterium*

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1 Визначення потреби у пробіотику на основі біомаси *Bifidobacterium adolescentis* MC-42

Бактерії роду *Bifidobacterium* займають найбільшу частину мікробіоти кишечника людини з народження і протягом всього її життя. Біфідобактерії синтезують амінокислоти, білки, вітаміни групи В, вікасол, ніотинову і фолієву кислоти, речовини з антиоксидантною активністю, а також мають антагоністичну активність до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів [15]. Це сприяє нормальному функціонуванню систем органів, зокрема, шлунково-кишкового тракту.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.08 КР ПЗ</i>		
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробник</i>	<i>Бондарчук А.В.</i>				<i>Розділ 3</i> <i>Техніко-економічне</i> <i>обґрунтування</i>		
<i>Керівник</i>	<i>Старовойтова С.О.</i>						
<i>Н. конто</i>					<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Консильт</i>						19	64
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		

Безліч антропогенних факторів: хімічні викиди в навколишнє середовище, забруднення води, стреси, самолікування (особливо антибіотикотерапія), не правильне харчування – накладає негативний відбиток на функціонування нормальної мікрофлори організму людини, що призводить до важких інфекційних захворювань, таких як бактеріальні вагінози, гострі кишкові інфекції, дерматити, стоматити та інше. Оскільки біфідобактерії заселяють в основному кишечник і відповідають безпосередньо за його функціональний стан, розглянемо статистику по захворюванням ШКТ.

За даними Державної служби статистики України [16] за 2019 рік 86,9 тисяч жителів України хворіють або хворіли на гострі кишкові інфекції з них 56, 2 тисячі хворих – діти віком від 0 до 17 років [17]. У відсотковому еквіваленті це захворюваність серед дорослих складає 35 % (30415), а серед дітей – 65 %. Це може бути зумовлено ще не стійкою і не стабільною мікрофлорою кишківника у новонароджених дітей, яка залежить від вигодовування материнським молоком. В цей період діти дуже піддатливі до кишкових інфекцій.

Оскільки на сьогодні не виготовляються моноштамові пробіотики на основі біомаси *Bifidobacterium adolescentis* MC-42, що не дозволяє нам взяти дані з листка-вкладиша для подальшого дослідження, а зокрема визначення потреби у препараті, то візьмемо як аналог монокомпонентний пробіотик на основі *Bifidobacterium bifidum* - Біфдумбактерин-Біофарма.

Згідно інструкції [18] на даний препарат в одному флаконі препарату міститься 5 доз живої активної культури *Bifidobacterium bifidum* — не менше $5 \cdot 10^7$ КУО, яку розчиняють у кип'яченій воді кімнатної температури і вживають за 15-20 хв до прийому їжі. Добова доза, залежно від віку становить:

- 1 флакон 1 раз на добу – дітям до 6 місяців
- 1 флакон 1-2 рази на добу – дітям від 6 до 12 років
- По 1 флакону 2 рази на добу – дітям від 12 років і дорослим

Профілактичний курс становить 1-2 тижні, лікувальний – 3-4 тижні.

На упаковці та в листку вкладиші не вказана вага п'яти доз, тому проводилось зважування на аналітичних вагах у лабораторії, де було встановлено, що вміст

флакону, тобто 5 доз, важить 150 мг. Враховуємо вологу 5 % та те що в дану речовину вносять захисний розчин 30 % [19] тоді вміст культури становить 97,5 мг.

Потреба на курс лікування для дорослих :

$$P_{др} = 2 \text{ фл} \cdot 28 \text{ днів} \cdot 97,5 \text{ мг} \cdot 30 \cdot 415 \text{ др} = 166 \, 065 \, 900 \text{ мг} \approx 166 \text{ кг}$$

Загальна потреба на курс для дітей :

$$P_{дт} = 1 \text{ дз} \cdot 28 \text{ днів} \cdot 97,5 \text{ мг} \cdot 56 \, 200 \text{ дт} = 153 \, 426 \, 000 \text{ мг} \approx 154 \text{ кг}$$

Загальна потреба у Біфідумбактерині складає:

$$P_{\Sigma} = 166 + 154 = 320 \text{ кг}$$

Таблиця 3.1.1

Розрахунок річної потреби у Біфідумбактерині

Категорії хворих	Доза препарату на добу	Кількість прийомів доз на добу	Тривалість лікування, діб	Кількість хворих в Україні на 2019 рік, тис	Загальна кількість флаконів на всіх хворих, кг
1	2	3	4	5	6
Дорослі та діти старше 12 років	2 дози (по $5 \cdot 10^7$ КУО)	2	28	30415	166
Діти від 0 до 12 років	1 доза ($5 \cdot 10^7$ КУО)	1	28	56200	154
Всього					320

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Станом на 2020 рік в Україні зареєстровано 12 лікарських препаратів, до складу яких входять пробіотичні організми, вся інша маса – пробіотиків зареєстрована як біологічно-активні добавки. Основна маса пробіотиків все ж імпортується з інших країн. Такими країнами – постачальницями є Німеччина, Словенія, Італія, Канада, Франція, Польща та Індія [20]. Кількість пробіотичних препаратів закордонного виробництва складає 80 %, коли українського всього - 20 % [21]. Українськими виробниками пробіотиків є ПрАТ «Біофарма», ПАТ «Фармстандарт-Біолік», ДП «Ензим», ТЗОВ «Астрафарм» та ТЗОВ «О.Д. Пролісок» та інші, які реєструють продукцію як БаДи.

За видовим складом пробіотики, в які входять біфідобактерій складають 8 %, колі бактерій – 8% , лактобацил – 32 %, дріжджів -27 %.

В даній роботі ми розглядаємо перспективу використання моно компонентних пробіотиків на основі біомаси біфідобактерій, а саме *Bifidobacterium adolescentis* МС-42. Тобто, пробіотики, які містять один штам біологічного агента. Перевагою такого препарату є кращий лікувальний ефект, оскільки даний мікроорганізм затримується на триваліший час, через відсутність конкуренції збоку інших додаткових пробіотичних видів, які б мали вивільнитися разом з одного препарату[21].

Щодо виробництва саме монокомпонентних пробіотиків на основі біомаси біфідобактерій, то є лише один вітчизняного виробництва – «Біфідумбактерин», який виробляють два підприємства в Україні: ДП «Ензим» та ПрАТ «Біофарма». Всі інші - імпортного виробництва, або ж полікомпонентні (табл.3.1.2) [21].

Таблиця 3.1.2

Порівняльна характеристика пробіотичних препаратів

Країна-виробник	Препарат	Вид (штам) біфідобактерій	Дозування, КУО	Форма випуску	Джерело
Україна	Біфідумбактерин-Біофарма	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	не менше $5 \cdot 10^7$	Порошок або пориста маса для приготування розчину у флаконі.	https://compendium.com.ua/uk/
Україна (ДП «Ензим»)	Біфідумбактерин	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	не менш $1 \cdot 10^8$	Ліофілізат живих біфідобактерій по 5 та 10 доз у флаконах або пакетах	http://likicontrol.com.ua/
Україна	Біфікол	<i>Bifidobacterium bifidum</i> № 1	не менше $1 \cdot 10^7$	2 або 3, або 5 доз у флаконі	http://likicontrol.com.ua/
		<i>Escherichia coli</i> М 17	не менше $1 \cdot 10^7$		
Росія	Біфіліз	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Не менше $1 \cdot 10^7$	Порошок або пориста маса для приготування розчину у флаконі, супозиторії	https://www.piluli.kharkov.ua/
Росія	Пробіфор	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (сорбовані на активованому)	Не менше $5 \cdot 10^8$	Порошок або пориста маса для приготування розчину у флаконі	https://www.vidal.ru/

		вугіллі)			
Данія	Біфіформ	<i>Bifidobacterium longum</i>	10^7	Алюмінієва туба, що містить 20 та 30 капсул, закрита кришкою з десикантом, вміщена у картонну упаковку.	http://likicontrol.com.ua/
		<i>Enterococcus faecium</i>	10^7		
Україна	Біфацил	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	$5 \cdot 10^7$	Капсули по 500 мг	https://tabletki.ua/uk/
		<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	$5 \cdot 10^7$		

Значно кращим варіантом монокомпонентного пробіотика є Біфідин - препарат, який містить монокультуру *Bifidobacterium adolescentis* МС-42, а також продукти її життєдіяльності, що справляє значно кращий лікувальний ефект. Протягом культивування дана культура накопичує в клітині та культуральній рідині поліфосфатні включення (волютин), білково-полісахаридний комплекс, лужні протеази та декстринази. Окрім того даний штам продукує специфічні ферменти, такі як арабінофураногідролазу, альфа-галактозу, протеїназу, які є відповідальними за важливі фізіолого-біохімічні процеси у ШКТ [22].

Даний пробіотик був запатентований у 2004 році, але станом на 2021 рік не виготовляється, хоча має значно кращий терапевтичний ефект ніж Біфідумбактерин, оскільки позитивний ефект у лікуванні гострих кишкових інфекцій досягається при застосуванні лише одного пробіотика, що значно краще ніж використання антибіотиків, які викликають резистентність.

За даними, наведеними вище, можна зробити висновок, що українське фармацевтичне виробництво не задовольняє потреби у виготовленні моноштамових пробіотиків, особливо на основі біфідобактерій. Якщо зважати на кількість препаратів аналогів зареєстрованих в Україні (таб.3.2), то частина ринку, що припадатиме на препарат на основі *Bifidobacterium adolescentis* МС-42 становитиме 1/8 (12,5%). До того ж врахуємо 7,5% для виготовлення на експорт. Загалом потреба в даному пробіотичному препараті становить 20 %.

Тобто, зважаючи на швидкий позитивний ефект при лікуванні хворих на кишкові інфекції без антибактеріальної терапії, потужність виробництва пробіотика Біфідіна, який в перспективі може використовуватися для лікування кишкових інфекцій як етіотропна терапія має складати 64 кг препарату.

$$G_{\text{п}} = 320 \text{ кг} \cdot 0,20 = 64 \text{ кг/рік}$$

За даними досліджень згідно патента [23] найбільша кількість живих клітин виділяється за 18 годин - $1 \cdot 10^{10}$ КУО/мл. В літературі не наведена концентрація біомаси (г/л) в культуральній рідині, та зважаючи на компоненти поживного середовища вирахувати теоретичний вихід біомаси неможливо, тому для подальших розрахунків приймемо приблизну концентрацію біомаси для мікроорганізмів даного виду яка становить 6 г/л.

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Отже, щоб забезпечити медицину пробіотиком «Біфідин» необхідно насинтезувати 64 кг на рік протягом $T_{\text{рд}} = 100$ робочих днів.

Загалом культивування для нарощення необхідної нам біомаси походить протягом 18 год, але необхідно врахувати додаткові процеси підготовки ферментера: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація апарату (1 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год), які загалом займають 7 годин. Тобто $T_{\text{цф}} = 18 + 7 = 25$ годин. Також ми можемо скоротити кількість робочих днів за рахунок ферментера більшого об'єму, що дозволить нам зекономити час, який можна витратити на виготовлення іншого препарату.

Розрахуємо кількість ферментаційних циклів на рік :

$$N_{\text{цк}} = \frac{24 \cdot T_{\text{рд}}}{T_{\text{цф}}} = \frac{24 \cdot 100}{25} = 96$$

Кількість продукту за цикл, кг /цикл

$$V_{\text{цк}} = \frac{V_{\text{нт}}}{N_{\text{цк}}} = \frac{64}{96} = 0,67$$

Об'єм $V_{кр}$, що зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат при виділенні $E_{св}$, m^3

$$V_{кр} = K_1 \cdot G_{цк} \cdot C_{Ргп} / X_{кр} \cdot (1 - E_{св}) = (1,1 \times 0,67 \times 0,9) / (6 \times (1 - 0,15)) = 0,13$$

Визначаємо робочий об'єм ферментера, $V_{ф}$, m^3

$$V_{ф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 0,13 / (1 - 0,1) = 0,144$$

Приблизний геометричний об'єм ферментера, m^3

$$V_{пф} = V_{ф} / K_{ф} = 0,144 / 0,7 = 0,20$$

З таблиці 1 вибираємо найближчий за об'ємом ферментер, m^3

$$V_{Гф} = 0,20$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення $K_{уф}$, частка

$$K_{уф} = V_{ф} / V_{Гф} = 0,144 / 0,20 = 0,72$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.

За виробничий цикл отримуємо $V_{пц} = 130$ л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини враховуємо її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{ф}$), які становлять 10%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб.1} = \frac{V_{пц}}{1 - E_{ф}} = \frac{130}{1 - 0,1} = 144,4 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,7$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{ф}$), що становить:

$$V_{ф} = \frac{V_{роб.1}}{K_{зап}} = \frac{144,4}{0,7} = 206,2 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{ф} = 0,20 m^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап} = \frac{V_{роб.1}}{V_{ф}} = \frac{144,4}{200} = 0,72$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{ф1}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + E_{\phi1}} = \frac{144,4}{1 + 0,1} = 103,1 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 144,4 - 103,1 = 41,3 \text{ л}$$

Для одержання 41,3 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплинності через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\phi2}$), які становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{41,3}{1 - 0,1} = 45,9 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,7$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера (V_{ϕ}), що становить:

$$V_{\phi1} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{45,9}{0,7} = 65,5 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{\phi1} = 0,06 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\phi1}} = \frac{45,9}{65,5} = 0,69$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{\phi2}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + E_{\phi2}} = \frac{45,9}{1 + 0,1} = 41,7 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 45,9 - 41,7 = 4,2 \text{ л}$$

Для одержання 4,2 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплинності через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\phi2}$), які становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{4,2}{1 - 0,1} = 4,6 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,7$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера (V_{ϕ}), що становить:

$$V_{\phi 1} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{4,6}{0,7} = 6,5 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{\phi 2} = 5$ л, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\phi 1}} = \frac{4,6}{6,5} = 0,7$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{\phi 2}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{псз}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + E_{\phi 2}} = \frac{4,6}{1 + 0,1} = 4,18 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пмз}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{псз}} = 4,6 - 4,18 = 0,42 \text{ л}$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{\text{пмз}} = 0,42$ л можна одержати культивуванням *B. adolescentis* МС-42 у колбах. Для цього використовуємо спеціальні флакони з притертими гумовими корками об'ємом $V_{\text{колб}} = 500$ мл з коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,4$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становить:

$$N = \frac{V_{\text{пмз}}}{V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}} = \frac{420}{500 * 0,4} = 2,1$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 2 флакони з гумовими корками для анаеробних культур.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу пробіотику у ферментері об'ємом 200 л з коефіцієнтом заповнення 0,7 відбуватиметься у три етапи:

- 1 – вирощування посівного матеріалу в 2 флаконах об'ємами 500 мл
- 2 – вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л
- 3 – вирощування інокуляту для виробничого біосинтезу в посівному апараті об'ємом 60 л

Узагальнені дані розрахунку техніко-економічного обґрунтування

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, V_f , л	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$, частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{роб}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$, л
1	200	0,72	144,4	103,1	41,3
3	60	0,69	45,9	41,7	4,2
4	5	0,7	4,6	4,18	0,42
5	0,500	0,4	0,2	0,42	0,042

РОЗДІЛ 4

ОБґРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування способу культивування та типу ферментера

Bifidobacterium adolescentis MC-42 може рости та розмножуватись тільки за певних умов, які на пряму залежать від фізіолого-біохімічних властивостей агента, зважаючи на це підбирають відповідний спосіб культивування.

- Продуцент є анаеробом, тобто потрібно забезпечити безкисневі умови. Саме глибинний спосіб культивування дає таку змогу, він широко використовується для отримання біомаси мікроорганізмів, на відміну від поверхневого. Глибинне культивування має свої переваги: простота обслуговування та можливість автоматизації. Також для даної умови необхідне заповнення залишкового об'єму ферментера інертним газом (аргон, вуглекислий газ, азот та ін.). Зачасту культивування строгих анаеробів відбувається під тиском азоту, оскільки він повністю витискує кисень.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.08 КР ПЗ</i>		
<i>Зм</i>	<i>Адж.</i>	<i>№</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробник</i>	<i>Бридачук А.В.</i>				<i>Розділ 4</i>		
<i>Керівник</i>	<i>Старовайтова С.О.</i>						
<i>Н. контр.</i>					<i>Літера</i>	<i>Аркиш</i>	<i>Аркишів</i>
<i>Консильт</i>						28	64
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		
					<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>		

- Вирощування біомаси бактерій можливе як і періодичним так і безперервним способом, кожен з яких має свої переваги.

- Під час безперервного культивування свіже культуральне середовище надходить у ферментер безперервно, паралельно відводиться така сама кількість клітинної суспензії. Принципом безперервних процесів служить рівновага між приростом біомаси за рахунок поділу клітин і їх зменшенням у результаті розведення свіжим середовищем. Такий спосіб культивування широко не використовують у виробництві пробіотиків, хоча застосування безперервних процесів ферментації створює умови для ефективного регулювання й керування процесами біосинтезу.

- Під час періодичного мікроорганізми вирощуються в стерильних умовах без додавання свіжого культурального середовища, внаслідок чого проходять 4 фази розвитку, найбільша кількість клітин відмічається в експоненційній фазі. Саме тому протягом виробничого біосинтезу періодично відбирають проби культуральної рідини для визначення кількості живих клітин (КУО/см³), і таке культивування закінчується при досягненні концентрації живих біфідобактерій не менше 10¹⁰ в 1 мл [1]. Періодичні методи культивування мікроорганізмів широко використовуються в даний час в промисловій біотехнології. Техніка періодичної культури дозволяє отримати вихідні дані, витратні коефіцієнти та кінетичні характеристики культури, а також раціонально використати поживне середовище в повному обсязі [24] .

В нашому випадку найкращий варіант – періодичне культивування, оскільки це є економічно вигідно та перевірено досвідом.

- Основною вимогою під час організації виробництва пробіотиків є наявність ізольованих приміщень і відповідних технічних засобів для забезпечення асептичних умов, так як існує великий ризик контамінації даної культури, оскільки є й інші організми здатні розвиватися за умов, необхідних для *Bifidobacterium adolescentis* MC-42. Саме тому конструкція обладнання має запобігати зовнішній контамінації, а також забезпечувати зручність і ефективність його очищення та стерилізації. До того ж кожні 2 год культивування з ферментера відбирають проби

культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю і визначення концентрації живих клітин.

• При періодичному культивуванні, внаслідок споживання субстрату і молочнокислого бродіння, *Bifidobacterium adolescentis* виділяє різні продукти життєдіяльності, зокрема молочну та оцтову кислоту, що підкислює поживне середовища, щоб не порушувати необхідну кислотність (рН 6,8 – 7,3) середовища використовуються титрувальні агенти, в нашому випадку для підлужнення середовища (6% гідроксид натрію, аміачна вода). Найкращим є 6% розчин їдкого натрію, зважаючи на його розповсюдженість, ефективність та дешевизну.

Вибір типу ферментера

Ферментер для культивування *Bifidobacterium adolescentis* МС-42 має відповідати вимогам, які необхідні для росту і розмноження продуцента біомаси.

Існуючі промислові ферментатори за способом підведення енергії на аерацію й перемішування можна підрозділити на три групи:

- ✓ апарати з механічним перемішуванням і барботажем (комбіновані);
- ✓ з ежекційною системою аерації (підведення енергії до рідкої фази)
- ✓ барботажні (підведення енергії до газової фази).

1. Для ферментної промисловості найбільший інтерес представляє перша група апаратів, призначена для асептичних процесів. А барботер слугуватиме для подачі інертного газу.

2. Щодо перемішувального пристрою, є великий вибір мішалок: лопатеві з плоскими лопатями; пропелерні з гвинтовими лопатями; турбінні мішалки; спеціальні мішалки. В даному випадку достатньо буде простої лопатевої мішалки, оскільки перемішувальний пристрій (70 об/хв) вмикають на 2-3 хвилини перед відбором проб та після подачі регулятора рН, також в'язкість рідини є не високою. Тому лопатева мішалка не тільки впорається із своєю задачею (розподілити компоненти), а й допоможе заощадити кошти, оскільки має невисоку вартість виготовлення.

3. Для відбору проб мають бути встановлені у ферментері спеціальні пробовідбирачі культуральної рідини.

4. Система піногасіння в даному випадку не потрібна, оскільки забезпечуються анаеробні умови.

5. Контроль показників рН, оптичної густини, температури, рО₂, швидкості обертання мішалки може здійснюватися вбудованим автоматизованим блоком управління, що значно полегшить роботу.

6. Також такий ферментер повинен мати підводи для посівного матеріалу, поживних середовищ, пари, води, відводи продуктів ферментації, газів що виділяються.

7. Для рівномірного розподілу тепла та його збереження необхідна парова сорочка в яку подається холодна вода або глуха пара.

8. Ферментер має бути виготовлений з високолегованих марок сталі або з титану, внутрішня поверхня його повинна бути відполірована. Найкращим варіантом є нержавіюча сталь, оскільки вона стійка до корозій та агресивних поживних середовищ.

4.1.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Для знезараження повітря у кімнатах, де працюють з посівним матеріалом використовують ультрафіолетове випромінювання. Також повітря подається в лабораторію, бокс та виробниче приміщення через головні фільтри типу НЕРА класу Н14, який має найвищу ступінь фільтрації, а саме 99,995% [25].

Культивування *Bifidobacterium adolescentis* МС-42 відбувається в анаеробних умовах, які забезпечуються подачею інертного газу, а саме азоту, оскільки бактерія-продуцент – строгий анаероб.

Азот подається з балону в очисник балонних газів, задля економії індивідуальних фільтрів типу НЕРА (попередження завчасного забивання), далі у посівні апарати та ферментер через індивідуальні фільтри, пропускання через які забезпечує максимальну стерильність. Також попередньо необхідно встановити редуктор, щоб знизити тиск в балоні перед подачею газу в інокулятори.

Необхідно замовити декілька (до 3-х) балонів з азотом об'ємом 5 л [26], щоб забезпечити непереривну подачу азоту протягом циклу. Надалі можна повторно заповнювати використані балони азотом.

4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Класифікація мийних та очисних засобів відображена в табл. 4.1.3.1 [27]:

Таблиця 4.1.3.1.

Класифікація мийних засобів

Група	Механізм очищення	Типові елементи
Технічні мийні засоби (ТМЗ)	омилення, емульгування і диспергування забруднення	синтетичні змивні речовини (СЗР)
Лужні сполуки	омилення, емульгування забруднення	водні розчини лугів і лужних солей
Поверхнево-активні речовини (ПАР)	емульгування і диспергування через зниження вільних меж фазової енергії змивних розчинів і послаблення поверхневих сил, які утримують забруднення	ПАР різних класів
Розчинники	розчинення чи механічне видалення забруднення без зміни хімічного складу	органічні розчинники змивання
Розчинно-емульгуючі засоби (РЕЗ)	розчинення й емульгування забруднення	речовини на основі розчинників і ПАР
Емульсійні складники	розчинення, змивання й емульгування забруднення	двофазні суміші (воднева і неводнева фази) розчинників у

Обмеження за складом залежно від оброблювального об'єкта

Біореактор складається з нержавіючої сталі, тобто в склад входить хром, що утворює з киснем захисну плівку, яка стійка до факторів навколишнього середовища. Підлога та стіни також мають гладку, стійку до води та деззасобів поверхню без тріщин відповідно до нормативів. Тобто вибираючи миючий засіб, ми можемо зосередитись на врахуванні його токсичності та миючих властивостей.

Обґрунтувати вибір миючого засобу для оброблювальних об'єктів

Для миття стін, поверхонь, підлоги, вікон підприємство використовує миючий засіб з дезінфекційною дією «Бриліант»[28], який складається з бензалконію хлорида (0,1%) та глютаральдегіду (0,8%). Оскільки препарат має широкий спектр бактерицидної дії та низьку ступінь токсичності, а саме відноситься до 4 класу малонебезпечних сполук. Окрім того він виконує 2 функції : миття та дезінфекцію.

Також для очищення стін, вікон, комунікацій, інвентарю буде використовуватись технічний миючий засіб «Вімол» (ТУ У 22902465.009-99). Його перевагами є не токсичність, не горючість, стабільність розчинів, висока миюча дія препарату та ефективність при роботі з «жорсткою» водою.

Порівняльна оцінка різних класів хімдеззасобів[29,30]

В наш час асортимент деззасобів досить великий. В державному реєстрі дезінфекційних засобів за 2020 налічується 620 дезінфектантів [31].

•**спиртові** (етанол, ізопропанол, пропанол, бутандіол). Їхні переваги, крім ефективності, полягають в тому, що вони не залишають слідів, оперативно випаровуються, не є небезпечними і коштують недорого. Популярні антисептичні засоби цієї групи: АХД 2000 ультра, Дезодерм, Неостерил;

•**хлоровмісні**. Порошкоподібні, таблетовані та рідкі композиції з широким знезаражувальним впливом (допомагають боротися з бактеріями, вірусами і грибами). Існує три покоління. Кожне нове покоління характеризується ширшим спектром дії, меншою агресивністю та нестабільністю. Як правило, універсальні, діють швидко і безпечно, мають характерний хлорний запах. Застосовуються для поточних, профілактичних, завершальних і генеральних прибирань, для дезінфекції, антибактеріальної та санітарно-гігієнічної обробки в побуті та промисловості. Здатні знебарвлювати тканини і провокувати корозію металу, що необхідно враховувати при використанні. Крім того, хлор і його сполуки належать до сильних гепатоксинів з канцерогенною активністю. Затребувані найменування: Гіпохлорит натрію, Вапно хлорне, Йод однохлористий, Бланідас 300, Дезактін, Ді-Хлор, Жавель Клейд, Клорсепт, Новохлор-Екстра (Неохлор), Хлорамін Б, Хлорантоїн, Лагоцид 300, 600;

•**фенольні** (фенол і його похідні). Характерна здатність – формування плівки-захисту, що складно забирається з обробленої поверхні. Завдяки цьому дезінфекційний ефект зберігається в рази довше. Це, зокрема, чистий фенол, а також трикрезол, креолін, лізол та ін.;

• **альдегідні**. Оліїсті рідкі засоби широкого спектру дії, які борються навіть зі спорами грибів. Мають антибактеріальні і в'язучі властивості. Легко проходять до мікробних осередків на матеріалах, не шкодячи тканинам і металам. Це, зокрема, Глутаровий альдегід та Формалін;

•**пероксидоводневі** (з перекису водню). Цікаві відсутністю специфічних ароматичних параметрів та подразнювальної дії, а також низькою токсичністю. Вважаються найбезпечнішими для зовнішнього середовища деззасобами. Підходять для знезараження корозійностійких металевих, скляних і пластмасових поверхонь. Перш за все, мається на увазі сам Пероксид водню 35 %, 50 %, 60 %;

•**з третинних та четвертинних амінів**. Малотоксичні, з високими мийними параметрами, ефективні проти переважної кількості штамів бактерій. **Наприклад: Клерсайд Амін, Ультрадез, Оптімекс, Дезефект, Максисан та інші;**

•**гуанідинові** (на основі гуанідину і його похідних). Здійснюють переважно бактерицидну і віруліцидну дії. Утворюють після обробки стійкі захисні плівки. Завдяки нетоксичності активно застосовуються в харчопромі;

•**комбіновані** (мають в своєму складі кілька активних компонентів з різних груп).

Обґрунтування вибору дезінфекційних засобів для обробки об'єктів

Проблемою є виникнення резистентних форм мікроорганізмів до деззасобів, тому важливим є замінювати його декілька разів на рік, а саме на засіб з іншою основою.

Тому необхідно підібрати як мінімум 2 дезінфекційних засоби

Для миття поверхонь, стін, підлоги, вікон, комунікацій використаємо миючий засіб «Бриліант» (обґрунтовувалось вище) та будемо чергувати із деззасобом «Хлорель», діючою речовиною якого є дихлорізоціанурат натрію. Дана речовина відноситься до 4 класу малотоксичних речовин, має широкий спектр антибактеріальної та спороцидної дії (зазначено в інструкції). [32]

Для дезінфекції обладнання немає необхідності використовувати хімічні засоби, оскільки буде проведена стерилізація гострою парою за температури 120 °С протягом 30 хв. [33]

Таблиця 4.1.3.2.

№	Найменування підрозділів об'єкта	Кількість підрозділів кв. м	Площа, що підлягає дезінфекції		Дезінфікуючий засіб			Кратність обробок			Потреби в деззасобах, л (кг)			
			При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні	назва	Концентрація розчину, %	Норма витрати робочого розчину	На добу	На місяць	На рік	На одну обробку		На місяць	На рік
											При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні		
1	Виробниче приміщення (підлога, стіни, двері, вікна, комунікації, інвентар)	87,5	87,5	137,5	Бриліант	2	100 мл на 1 м ²	1	30	100	5,4	275	164	540
					Хлорель	0,015	1 табл на 10 л	1	30	100	0,5	27	16	54
2	Лабораторія (підлога, стіни, двері, вікна, комунікації, інвентар)	51,5	51,5	79	Бриліант	2	100 мл на 1 м ²	1	30	100	2,4	151	73	240
					Хлорель	0,015	1 табл на 10 л	1	30	100	0,2	15	7	24

Орієнтовний розрахунок потреби в дезінфекційних засобах для дезінфекції поверхонь у приміщеннях, обладнання тощо на 2021 рік

Розрахуємо концентрацію деззаобу за активnodіючою речовиною для застосування деззасобу «Бриллиант» :

$$X = (C \cdot M) / 100 = (2\% \cdot (0,9\% + 0,8\%)) / 100 = 0,034$$

де X – концентрація діючої речовини в робочому розчині деззасобу

C – концентрація робочого розчину деззасобу за препаратом, згідно з інструкцією (методичними вказівками) із застосування, %, режим вірусних інфекцій;

M – кількість, %, активно діючої речовини (або суми концентрацій кількох активно діючих речовин, якщо вони із однієї хімічної групи), в деззасобі, вказано в інструкції із застосування (методичні вказівки)

Розрахунок концентрації деззасобу «Хлорель» за активnodіючою речовиною для застосування:

$$X = (C \cdot M) / 100 = (0,015 \cdot 99,5) / 100 = 0,015$$

Розрахуємо площу поверхні для обробки. Обладнання об'ємом 600, 60 і 6 л займає разом площу в 4 м^2 , врахуємо, що відстань між ферментером та посівними апаратами від стін має становити від 1 м. Тоді за розрахунками кімната, де будуть розміщені ферментери має становити не менше ніж 10 м^2 у довжину, 5 м^2 у ширину та $2,5 \text{ м}^2$ у висоту. Тоді площа поверхні стін становить $37,5 \text{ м}^2$, а підлоги 50 м^2 . Загальна площа, яку необхідно обробити - $87,5 \text{ м}^2$. Також при генеральному прибиранні обробляють стелю ($87,5 + 50 = 137,5$) Також необхідно врахувати площу мікробіологічної лабораторії, де площа підлоги буде становити 24 м^2 , а стін - $27,5 \text{ м}^2$, тобто загальна площа - $51,5 \text{ м}^2$, та врахуємо площу стелі 24 м^2 .

Розрахуємо загальну площу поверхонь для дезінфекції (додавання площі підлоги в приміщеннях і площі поверхонь обладнання та меблів)

$$S = S_{\text{підл}} + S_{\text{меб}} = 50 + 4 = 54 \text{ м}^2 \text{ для кімнати з апаратами}$$

$$S = S_{\text{підл}} + S_{\text{меб}} = 24 + 10 = 24 \text{ м}^2 - \text{для лабораторії}$$

Визначимо потребу в дезінфікуючому засобі «Бриліант» для обробки поверхонь :

$$\text{Одз} = 0,01 \cdot N \cdot K \cdot S \cdot \text{КОд} \cdot \text{Д} = 0,01 \cdot 0,1 \cdot 2 \cdot 54 \cdot 1 \cdot 100 = 10,8 \text{ л} - \text{для виробничого приміщення}$$

$$\text{Одз} = 0,01 \cdot N \cdot K \cdot S \cdot \text{КОд} \cdot \text{Д} = 0,01 \cdot 0,1 \cdot 2 \cdot 24 \cdot 1 \cdot 100 = 4,8 \text{ л} - \text{для лабораторії}$$

де: Одз (л) – загальний об’єм концентрату дезінфікуючого засобу (ДЗ) в літрах, необхідна для знезараження поверхонь приміщень [л];

N – норма витрати дезінфікуючого розчину в літрах на 1 м^2 (згідно з інструкціями щодо застосування конкретних препаратів при обробці методом протирання/зрошення) [м^2];

K – коефіцієнт, що дорівнює величині концентрації дезінфікуючого розчину по препарату [%];

S – площа оброблюваних поверхонь [м^2];

КОд – кратність обробки на добу;

Д – кількість діб в розрахунковому періоді (місяць, квартал, півріччя, рік).

Об’єм робочого розчину дезінфікуючого засобу для обробки поверхонь визначається за формулою:

$$\text{Опр/дз} = N \cdot S \cdot \text{КОд} \cdot \text{Д} [\text{л}] = 0,1 \cdot 54 \cdot 1 \cdot 100 = 540 \text{ л} - \text{для виробничого приміщення}$$

$$\text{Опр/дз} = N \cdot S \cdot \text{КОд} \cdot \text{Д} [\text{л}] = 0,1 \cdot 24 \cdot 1 \cdot 100 = 240 \text{ л} - \text{для лабораторії}$$

де: Опр/дз (л) – загальний об’єм робочого розчину дезінфікуючого засобу (ДЗ) в літрах, необхідна для знезараження поверхонь приміщень [л];

N – норма витрати дезінфікуючого розчину в літрах на 1 м^2 (згідно з інструкціями щодо застосування конкретних препаратів при обробці методом протирання/зрошення) [м^2];

S – площа оброблюваних поверхонь [м^2];

КОд – кратність обробки на добу;

Д – кількість діб в розрахунковому періоді (місяць, квартал, півріччя, рік).

Розрахуємо кількість сухого таблетованого деззасобу «Хлорель», необхідного для приготування необхідної кількості літрів робочого розчину.

X (одиниць ДЗ) = (Орр/дз • Код)/Оо/рр = (540• 1) / 10 = 54 – для виробничого приміщення

X (одиниць ДЗ) = (Орр/дз • Код)/Оо/рр = (240•114) / 10 = 24- для лабораторії

X (одиниць ДЗ) – кількість одиниць дезінфікуючого засобу (таблеток, сашеток), що вимагається для приготування розрахованого об'єму робочого розчину;

Орр/дз (л) – загальний об'єм робочого розчину дезінфікуючого засобу (ДЗ) в літрах, необхідна для знезараження поверхонь приміщень [л], розрахований за вищенаведеною формулою;

Код (одиниць ДЗ) – кількість одиниць дезінфікуючого засобу (таблеток, сашеток), що вимагається для приготування певної кількості обсягу робочого розчину дезінфікуючого засобу (5 або 10 літрів) згідно з таблицею приготування робочих розчинів Інструкції щодо застосування обраного засобу; Для приготування розчину в концентрації 0,015 необхідно 1 таблетка на 10 л води.

Оо/рр – одиниця об'єму робочого розчину деззасобу, на який проводиться розрахунок, наприклад 5 або 10 літрів з однієї таблетки/сашетки, відповідно до таблиці приготування робочих розчинів Інструкції щодо застосування обраного засобу.

4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний синтез життєздатних клітин ($1 \cdot 10^{10}$ КУО/мл) досягається за умов росту мікроорганізму *B. adolescentis* МС-42 на поживному середовищі з наступним складом (г/л):

Дріжджовий автолізат - 2,5;

Гідролізат казеїну - 1,5;

Молочна сироватка, яка містить 15% сухих речовин, з гідролізованою на 70% лактозою – 3,5;

Натрій фосфорнокислий двозаміщений 12-водний - 0,1;

Молоко знежирене - 2,4.

За розрахунками, наведеними в розділі 1, виробничий біосинтез відбувається в ферментері об'ємом 200 л, інокулянт отримують у три етапи: у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 5 та 60 л.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокулянту у флаконах

Для вирощування початкового посівного матеріалу використовують середовище яке наведено раніше. Стерилізація буде відбуватись в автоклаві, через невеликий об'єм поживного середовища 0,42л. Зважаючи на режим стерилізації компонентів поживного середовища, поділимо його на наступні композиції:

Композиція А: дріжджовий автолізат, гідролізат казеїну, молочна сироватка, молоко знежирене (режим стерилізації: 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв).

Композиція Б: натрій фосфорнокислий двозаміщений 12-водний (режим стерилізації: 131 °С, 0,15 МПа, 40 хв).

Розчин дріжджового автолізату, гідролізату казеїну, молочної сироватки та молока знежиреного (композиція А) є термолабільним і потребує м'якого режиму стерилізації. Сіль композиції Б стерилізують при стандартній для солей температурі.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокулянту в посівних апаратах

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 5 л.

В цій стадії необхідно 4,2 л поживного середовища, поділ компонентів на композиції буде відбуватись як і на стадії вирощування інокуляту у флаконах з спеціальними кришками.

Композиція А: дріжджовий автолізат, гідролізат казеїну, молочна сироватка, молоко знежирене (режим стерилізації: 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв).

Композиція Б: натрій фосфорнокислий двозаміщений 12-водний (режим стерилізації: 131 °С, 0,15 МПа, 40 хв).

Розчин дріжджового автолізату, гідролізату казеїну, молочної сироватки та молока знежиреного (композицію А) готують і стерилізують в автоклаві, за наступного режиму стерилізації: 112°С, 0,05 МПа упродовж 30 хв. Розчин солі (композиції Б) стерилізують в інокуляторі при стандартній для солей температурі (131 °С, 0,15 МПа, 40 хв). Потім подають композицію А перестальтичним насосом у інокулятор.

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 60 л.

Для цієї стадії необхідно 42 л поживного середовища, поділ композицій відбувається як і для попередньої стадії. Композицію А готують і стерилізують в окремому реакторі-змішувачі. Композицію Б готують в окремому збірнику, а стерилізують в інокуляторі (для зменшення ймовірності контамінації). По закінченню стерилізації композицій в інокулятор перистальтичним насосом подають композицію А.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Для виробничого біосинтезу необхідно 103 л поживного середовища, стерилізація та поділ компонентів для виробничого біосинтезу буде аналогічно попереднім стадіям.

Розчин дріжджового автолізату, гідролізату казеїну, молочної сироватки та молока знежиреного (композицію А) готують і стерилізують в реакторі-змішувачі за наступного режиму стерилізації: 112°С, 0,05 МПа упродовж 30 хв. Розчин солі (композиції Б) попередньо готують в реакторі і після приготування подають

виробничий ферментер, де відбувається стерилізація при 131 °С, 0,15 МПа, 40 хв. Композицію А перекачують у ферментер за допомогою перистальтичного насоса.

Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Оскільки компоненти поживного середовища не мають піноутворюючі властивості, а саме культивування відбувається в анаеробних умовах, то використовувати піногасники нема потреби.

В процесі культивування *B. adolescentis* МС-42 в результаті життєдіяльності виділяє кислоти, що в свою чергу призводить до зміни рівня рН яке не бажане, так як для кращого накопичення біомаси необхідно забезпечити оптимальний для продуцента рівень рН (6,8-7). Тому необхідно передбачити стадію приготування та стерилізації титрувального агента, в якості якого будемо використовувати 4М розчин гідроксиду натрію з розрахунку в кількості 0,2% від об'єму культуральної рідини. В подальшому регулювання рН відбуватиметься за допомогою рН-датчика, що автоматично буде титрувати культуральну рідину. Розрахунок кількості титрувального агента наведено в *таблиці 4.1.4.1.*

Таблиця 4.1.4.1

Розрахунок вмісту та особливості приготування розчину NaOH

Об'єм середовища, л	NaOH	
	Об'єм, мл	Особливості приготування
0,4	-	-
4,2	8	у колбі на 50 мл
41,7	83	У колбі 250 мл
103	206	у колбі на 500 мл

РОЗДІЛ 5

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу пробіотичного препарату.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
Б-1	Балон	1	Ємність 10 л, робочий тиск 14,7 МПа, вага балону 15 кг, виготовлений відповідно ГОСТ 949-73. Виробник ООО «Ресивер» [26]
ОБ-2	Очищувач балонних газів	1	Пристрій для очищення газів ClickOn. Виробник A-FLOW (Франція). Чистота газу на виході – більше 99,999%. Розміри : 20 см×Ø 3,2 см, вага : 0.6 кг, термін придатності – до 3-х років [34]
ІФ-3 ІФ-6 ІФ-10	Індивідуальний фільтр	3	Індивідуальний фільтр НЕРА, клас Н14, ефективність 99.995%, площа фільтрації 2,7 - 20 м ² , пропускна здатність 270-2000 м ³ відповідно. Матеріал – скловолокно. Тестовано згідно EN 1822; стійкість до вологи до 100%; витримує температуру повітря до 70 °С; не містить силікон. Має паспорт і висновок СЕС. Виробник: «NEW FILTER» (Україна) [35]
ІН-4	Інокулятор для вирощування посівного матеріалу об'ємом 5 л	1	Біореактор BioFlo 320, об'ємом 5 л, розмірами 40,6×40,6×66см виготовлений із боросилікатного скла та нержавіючої сталі 316L. Забезпечений мішалкою по типу «морський пропеллер» з частотою перемішування до 500 об/хв., а також датчиками температури, тиску, рН. Присутня система подачі та контролю інертного газу. Забезпечений пробовідбірним клапаном [36].

<i>НУХТ БТЕК 04.02.08 КР ПЗ</i>				
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розробник</i>	<i>Бондарчик А.В.</i>			
<i>Керівник</i>	<i>Старовойтова С.О.</i>			
<i>Н. контр</i>				
<i>Консульт</i>				
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>			
<i>Розділ 5</i>			<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>
<i>Специфікація обладнання</i>				<i>Аркшів</i>
				43
			<i>Кафедра БТМ</i>	
				64

Р-5 Р-8	Реактор-змішувач для приготування розчину солей	2	Реактор від виробника Тирит з нержавіючої сталі об'ємом 5 та 10 л; розмірами 450 х 250 х 1430 мм ; оснащений сорочкою та якірною мішалкою з тефлоновими скребками [37]
ІН-7	Інокулятор для вирощування посівного матеріалу об'ємом 60 л	1	Біореактор BIOSTAT CultiBag STR. Об'єм апарату – 60 л; вмонтована система подачі газу, датчики рН, температури, кисню, пробовідбірним клапаном. ; перемішування забезпечується лопатевою мішалкою 200 об/хв; [38]
Р-9	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації	1	Виробник «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна). Реактор-змішувач СЕон 0,010 м ³ сталевий емальований. Габаритні розміри: довжина – 420 мм; висота - 500 мм; ширина – 350 мм. Перемішувачий пристрій – якірна мішалка з частотою обертання 50 об/хв. Оснащений змішувачем [39]
Ф-11	Ферментер для виробничого біосинтезу	1	Об'єм апарату – 200 л; матеріал – нержавіюча сталь; виробник - Solaris Biotech; діаметр – 525 мм, висота – 1000 мм; витримує тиск до – 0,39 МПа; перемішування здійснюється лопатевою мішалкою зі швидкістю від 1 до 2000 об/хв, обладнаний датчиками температури, тиску, піни, рН, кисню, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном, оснащений системою СІР-мийки[40]

РОЗДІЛ 6

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Опис технологічної схеми процесу отримання пробіотичного препарату на основі біомаси *Bifidobacterium adolescentis* MC-42

Технологічна схема отримання біомаси *B. adolescentis* MC-42 включає в себе допоміжні роботи (підготовка інертного газу, приготування і стерилізація титрувальних агентів та поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту).

ДР 1. Підготовка інертного газу для культивування

ДР 1.1. Подача інертного газу

Азот через вентель подається з балону (Б1) до очищувача балонних газів (ОБ-2) ClickOn виробника A-FLOW (Франція), для очищення газів до 99,9%.

ДР 1.2. Очищення азоту в індивідуальних фільтрах.

Індивідуальні фільтри (ІФ-3, ІФ-7, ІФ-11) встановлюються безпосередньо перед посівним апаратом (ТП 4.4, ТП 4.5) та ферментером (ТП 5.1). Азот з очищувача(ОБ-2) до посівних апаратів поступає саме через них , тим самим додатково проходить холодну стерилізацію на 99,999%.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування і стерилізація розчину 4М NaOH для підлужнення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 5л

Для приготування 8,4 мл розчину 4 М натрій гідроксиду [41], який буде використаний на етапі вирощування посівного матеріалу для підтримання оптимальних умов росту мікроорганізму в посівному апараті об'ємом 5 л, на технічних терезах зважити 0,5 г кристалічного NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 50 мл і додають 10 мл піпеткою 8,4 мл дистильованої води , перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.08 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Розділ 6</i> <i>Опис технологічної схеми</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Бондпачик А.В.</i>						45	64
<i>Керівник</i>	<i>Старовайтова С.О.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. кант</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) впродовж 40 хв. Простерилізований розчин до ТП 4.4.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація розчину 4М NaOH для підлужнення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 60л.

Для приготування 83,4 мл розчину 4М натрій гідроксиду на технічних терезах зважують 5 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають в колбу об'ємом 250мл і додають мірним циліндром (об'ємом 100 мл) 83,4 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) впродовж 40 хв. Простерилізований розчин до ТП 4.5.

ДР 2.3. Приготування і стерилізація розчину 4М NaOH для підлужнення поживного середовища в ферментері об'ємом 200 л.

Для приготування 206 мл розчину 4М натрій гідроксиду на технічних вагах зважують 12,36 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають в колбу об'ємом 500мл і додають 206 мл дистильованої води за допомогою мірного циліндра об'ємом 250 мл, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) впродовж 40 хв. Простерилізований розчин до ТП 5.1.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживних середовищ для культивування інокуляту в колбах

Для вирощування інокуляту потрібно 0,42 л поживного середовища (ПС). Розрахунки об'ємів компонентів для приготування поживного наведено у таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,42 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Дріжджовий	2,5	1,05	А	0,25

екстракт				
Гідролізат казеїну	1,5	0,63		
Молочна сироватка	3,5	1,47		
Молоко знежирене	2,4	1,01		
Вода		250 мл		
Na ₂ HPO ₄	0,1	0,04	Б	0,17
Вода		170 мл		
Усього				0,42

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На торсійних вагах зважують 1,05 г дріжджового екстракту, 0,63 г гідролізату казеїну, 1,47 г молочної сироватки і 1,01 г молока знежиреного, наважку поміщають в колбу об'ємом 500 л. Туди ж додають 250 мл води питної, яку попередньо відміряли у мірному циліндрі об'ємом 1 л. Всі компоненти перемішують і накривають ватно-марлевым корком. Колбу відправляють у автоклав, встановлюють режим стерилізації 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв. Простерилізований розчин до *ТП 4.3.* Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На торсійних терезах зважують 0,04 натрію фосфорнокислого двозаміщеного 12-водного і поміщають в колбу об'ємом 250 мл, куди додають 170 мл питної води, яку попередньо відміряли у мірному циліндрі об'ємом 500 мл. Композицію перемішують і закривають ватно-марлевым корком. Далі колбу поміщають у автоклав і стерилізують протягом 40 хв за 131 °С, 0,15 МПа. Простерилізований розчин до *ТП 4.3.* Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для посівного апарату об'ємом 5л.

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 5 л (ІН-3), потрібно приготувати 4,18 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 4,18 л середовища наведено у *таблиці 6.2.*

Таблиця 6.2

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 5 л.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 4,18 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Дріжджовий екстракт	2,5	10,45	А	1,5
Гідролізат казеїну	1,5	4,5		
Молочна сироватка	3,5	14,63		
Молоко знежирене	2,4	10,03		
Вода		1,5 л		
Na ₂ HPO ₄	0,1	0,42	Б	2,68
Вода		2,68 л		
Усього				4,18

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На аналітичних вагах зважують 10,45 г дріжджового екстракту, 4,5 г гідролізату казеїну, 14,63 г молочної сироватки і 10,03 г молока знежиреного, наважку поміщають у колбу об'ємом 2,5 л. Туди ж додають 1,5 л води питної, яку попередньо відміряли у мірному циліндрі об'ємом 1 л. Всі компоненти перемішують і накривають ватно-марлевим корком. Колбу відправляють у автоклав, встановлюють режим стерилізації 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв. Простерилізований розчин до ТП 4.4. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На торсійних терезах зважують 0,42 г натрію фосфорнокислого двозаміщеного 12-водного і поміщають в колбу об'ємом 0,5 л. У мірному циліндрі об'ємом 250 мл відміряють 0,28 л води питної і додають у колбу разом з Na₂HPO₄. Композицію перемішують і переливають в посівний апарат та доливають за допомогою лічильника 2,5 л питної води. Стерилізацію проводять безпосередньо у посівному

апараті при 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв. Простерилізований розчин доТП 4.4. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживних середовищ для посівного апарату об'ємом 60 л.

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 60 л (ІН-7), потрібно приготувати 41,7 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування даної кількості середовища наведено у таблиці 4.3.

Для засіву даного інокулятора потрібно внести 4,2 л посівного матеріалу, та необхідно враховувати конденсат (10%), оскільки стерилізація відбувається гострою парою у посівному апараті. Тоді об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 37,9 л.

Таблиця 6.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 60 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 41,7 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Дріжджовий екстракт	2,5	104,25	А	3,9
Гідролізат казеїну	1,5	62,55		
Молочна сироватка	3,5	145,95		
Молоко знежирене	2,4	100,08		
Вода		3,9 л		
Конденсат		0,39 л		0,4
Na ₂ HPO ₄	0,1	4,2	Б	34
Вода		34 л		
Конденсат		3,4л		
Усього				41,7

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 104,25 г дріжджового екстракту, 62,55 г гідролізату казеїну, 145,95 г молочної сироватки і 100,08 г молока знежиреного, наважку поміщають у реактор-змішувач (Р-5) об'ємом 5 л. Туди ж доливають через лічильник 3,9 л води питної (попередньо врахувавши 10 % конденсату від робочого об'єму ферментера), для кращого розчинення компонентів подають глуху пару в сорочку до температури 40 °С, вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення компонентів. Встановлюють режим стерилізації 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв. Простерилізований розчин до *ТП 4.5*. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 4,2 г натрію фосфорнокислого двозаміщеного 12-водного і поміщають в колбу об'ємом 1 л. У мірному циліндрі об'ємом 500 мл відміряють 500 мл води питної і додають у колбу разом з Na_2HPO_4 . Композицію перемішують до повного розчинення солі і в подальшому вміст колби поміщають в посівний апарат (ІН-7) та доливають через лічильник 33,5 л води питної. Стерилізацію проводять безпосередньо у посівному апараті при 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв. Простерилізований розчин до *ТП 4.5*. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживних середовищ для ферментера об'ємом 200 л

Для одержання посівного матеріалу в ферментері об'ємом 200 л (Ф-11), потрібно приготувати 103,1 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування даної кількості середовища наведено у *таблиці 6.4*.

Для засіву даного ферментера потрібно внести 41,3 л посівного матеріалу, та необхідно враховувати конденсат (10%), оскільки стерилізація відбувається гострою парою у посівному апараті. Тоді об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 93,8л.

Таблиця 6.4

Композиції стерилізації компонентів для біосинтезу у ферментері об'ємом 200 л

Компонент	Вміст,	Кількість для	Композиції	Об'єм
------------------	---------------	----------------------	-------------------	--------------

поживного середовища	г/л	приготування 103,1 л середовища, г		композиції V, л
Дріжджовий екстракт	2,5	257,75	А	7,8
Гідролізат казеїну	1,5	154,65		
Молочна сироватка	3,5	360,85		
Молоко знежирене	2,4	247,44		
Вода		7,8 л		
Конденсат		0,7 л	Б	0,7
Na ₂ HPO ₄	0,1	10,31		86
Вода		86 л		8,6
Конденсат		8,6 л		103,1
Усього				

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 257,75 г дріжджового екстракту, 154,65 г гідролізату казеїну, 360,85 г молочної сироватки і 247,44 г молока знежиреного, наважку поміщають у реактор-змішувач (Р-8) об'ємом 10 л. Туди ж через лічильник доливають 7,8 л води питної (попередньо врахувавши 10 % конденсату від робочого об'єму ферментера), вмикають перемішувач до повного розчинення компонентів і одночасно подають глуху пару в сорочку, досягаючи 40 °С, задля кращого і швидшого розчинення компонентів. Встановлюють режим стерилізації 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв. Простерилізований розчин доТП 5.1. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 10,31 г натрію фосфорнокислого двозаміщеного 12-водного і поміщають у реактор-змішувач (Р-9) об'ємом 10 л. Через лічильник подають 4 л води питної у реактор (попередньо врахувавши 10 % конденсату від робочого об'єму ферментера), для кращого розчинення компонентів у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 50 об/хв. Потім розчин самоплином подають у ферментер об'ємом 200 л (Ф-11) і через лічильник додають 82 л води питної. Стерилізацію проводять безпосередньо у

посівному апараті при 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв. Простерилізований розчин до *ТП 5.1*. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1 Підтримання колекційної культури

Ліофільно висушена маса *Bifidobacterium adolescentis* МС-42 повинна зберігатися у флаконі за температури 2-8 °С не довше 1 року.

ТП 4.2. Одержання робочої культури

В асептичних умовах до флакону з ліофільно висушеною біомасою *Bifidobacterium adolescentis* МС-42, додають фізіологічний розчин натрію хлориду (1 мл на дозу), ретельно перемішують та переливають суспензію клітин у пробірку об'ємом 5 мл із стерильним рідким середовищем Біфідум. Аналогічно готують іншу (додаткову) пробірку з робочою культурою. Інкують в термостаті за температури 37±1 °С протягом 48 годин. Після чого проводять мікроскопічний та мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікрофлори.

ТП 4.3. Вирощування інокуляту в колбі

У колбу (об'ємом 0,5 л) з простерилізованою композицією А (від *ДР 3.1.1*) під ламінарною шафою вносять композицію Б (від *ДР 3.1.2*). Далі переливають з пробірки робочу культуру (від *ТП 4.2*) у колбу з поживним середовищем, всі компоненти ретельно перемішують і розливають по 210 мл у два стерильних флакони. Їх закривають кришками на різьбі, щоб забезпечити анаеробні умови, і поміщають у термостат. Генерацію біфідобактерій вирощують за температури 37 ± 1 °С протягом 48 год. Після чого проводять мікроскопічний та мікробіологічний контроль.

ТП 4.4. Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 5 л

Приготовану та простерилізовану композицію А (від *ДР 3.2.1*), через засівну колбу вносять в інокулятор (ІН-4), де вже знаходиться простерилізована композиція Б (від *ДР 3.2.2*). Посівний матеріал (від *ТП 4.3*) через засівну колбу переносять у поживне середовище, де вирощують за наступних умов : t = 37 ± 1 °С, рН 6,8-7,3(регулюється автоматизованою системою подачі титранта (від *ДР 2.1*)), подача азоту через барбортер. Сигналом про закінчення експоненційної фази росту є

припинення зниження рН, що свідчить про нездатність більшості клітин зброджувати лактозу, тобто їх загибель. Закінчитись культивування має по середині експоненційної фази, коли кількість живих клітин найбільша. В даному випадку це 10-12 година. Відбирається посівний матеріал в якому проводиться мікробіологічний і мікроскопічний контроль.

ТП 4.5 . Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 60 л

В посівний апарат (ІН-7) об'ємом 60 л з простерилізованим розчином композиції Б (від ДР 3.3.2), самоплино з реактора (Р-5) вносять композицію А (від ДР 3.3.1). Далі подають посівний матеріал (від ТП 4.4) через трубу перетискування. Перемішують і культивують в анаеробних умовах протягом 10-12 годин при температурі 37 ± 1 °С (забезпечується подачею глухої пари у сорочку ферментера), кислотності 6,8-7,3 (регулюється автоматизованою системою подачі титр анта (від ДР 2.1)) з подачею через барбортер азоту. Після чого проводиться мікроскопічний та мікробіологічний контроль. Якщо посівний матеріал відповідає всім вимогам, його відправляють на стадію виробничого біосинтезу.

ТП 5. Виробничий біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 200 л

У ферментер об'ємом 200 л (Ф-12) з простерилізованою композицією Б (від ДР 3.4.2) самоплином подають простерилізовану композицію А (від ДР 3.4.1).

Через трубу перетискування подають одержану раніше посівний матеріал *Bifidobacterium adolescentis* МС-42 (ТП 4.5). Забезпечуються відповідні умови біосинтезу: кислотність 6,8-7,3, яка регулюється автоматизованою системою подачі 4М натрій гідроксиду (від ДР 2.1.1), температура повинна становити 37 ± 1 °С, забезпечення повністю безкисневих умов за допомогою інертного газу – азоту. Процес культивування триває в середньому 16-18 год. Кожні 2 години з яких відбираються проби для мікробіологічного контролю. Перемішуючий пристрій вмикається автоматично тільки перед відбором проб та після подачі титранта з частотою обертання 70 об/хв. Культивування закінчується, коли кількість живих біфідобактерій досягає значення 10^{10} КУО/см³ (середина експоненційної фази).

РОЗДІЛ 7

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Мікробіологічний контроль

7.1.1. Мікробіологічний контроль чистоти культури

Мікробіологічний контроль культуральної рідини *B. adolescentis* здійснюють кожні 2 години шляхом мікроскопіювання з імерсією пофарбованого за Грамом зразка, а також висівом штрихом на МПА і агаризоване середовище Сабуро (для виявлення сторонньої бактеріальної і грибною мікрофлори відповідно). Посіви на МПА витримують у термостаті за температури 38 ± 1 °С упродовж 48 год, на середовищі Сабуро – за 22 ± 1 °С протягом 72 год [1]. Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, плісняви та дріжджоподібних грибів. При поверхневому рості на твердому поживному середовищі в анаеробних умовах біфідобактерії утворюють добре окреслені гладенькі, випуклі колонії кремового або білого кольору, блискучі та м'якої консистенції; у товщі агару – характерні колонії у вигляді "гречаного зернятка" або "диску" [10]. Під мікроскопом біомаса *Bifidobacterium adolescentis* МС-42 має вигляд поліморфних паличок, які на кінцях роздвоюються, потовщуються або гілкуються, не утворюють спор та капсул, грампозитивні, нерухливі.

7.1.2. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Відбирають пробу простерилізованого поживного середовища в об'ємі 50 мл, висівають 0,1 мл з цієї кількості на чашки Петрі з сусло-агаром – для виявлення грибів та дріжджів, з м'ясо-пептонним агаром – для виявлення бактерій. Чашки з посівами загортають у папір і поміщають у термостат на 6–8 годин за температури 30–32 °С. На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів [42].

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.08 КР ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Док.</i>	<i>№</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Розділ 7</i>		
<i>Розробник</i>	<i>Бондарчук А.В.</i>				<i>Літера</i>	<i>Аршиш</i>	<i>Аршишів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Старовойтова С.О.</i>					54	64
<i>Н. контр.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консульт.</i>							
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>						

7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.2.1. Визначення концентрації живих клітин

Кількісний підрахунок живих клітин проводиться методом Коха [43]: в асептичних умовах відбирають 1 мл клітинної суспензії і поміщають у 9 мл фізіологічного розчину, потім послідовно новою піпеткою переносять по 1 мл у ряд пробірок з 9 мл фізіологічного розчину. З одержаних (попередньо ретельно перемішаних) розведень здійснюють висів у товщу пропіонатного агару у чашки Петрі. 1,0 мл з кожного розведення (починаючи з найбільшого) вносять у стерильні чашки Петрі, потім заливають розтопленим (40 °С) пропіонатним агаром. Вміст чашки розподіляють рівномірно по всьому її об'єму. Чашку залишають закритою до повного застигання агару, а потім перевертають догори дном і поміщають в анаеростат, забезпечують температуру $37 \pm 1^\circ\text{C}$ і через 3 доби здійснюють підрахунок колоній. Знаючи кількість колоній і ступінь розведення, визначають кількість мікроорганізмів за формулою:

$$N = \frac{(a \pm 2\sigma)K}{V},$$

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.

7.2.2 Визначення концентрації джерел вуглецю та азоту

Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом вуглецю в середовищі є лактоза, яка є основним вуглеводом таких компонентів поживного середовища, як молоко знежирене та молочна сироватка. Концентрацію лактози в поживному середовищі визначають за допомогою кондуктометричного ферментного біосенсора, в основі роботи якого лежить каскад ферментативних реакцій, у яких β -галактозидаза, мутаротаза та глюкозооксидаза поетапно розщеплюють лактозу до пероксиду водню та D-глюконолактону. Глюконолактон, у свою чергу, спонтанно гідролізується до глюконової кислоти, яка

дисоціює на залишок кислоти і протон, при цьому змінюється провідність розчину, яку й можна реєструвати за допомогою кондуктометричного перетворювача [44].

Визначення концентрації джерела азоту

Оскільки джерелами азоту в поживному середовищі є дріжджовий автолізат та гідролізат казеїну, то визначатимемо кількість саме амінного азоту методом формольного титрування [45]: відділяють біомасу центрифугуванням, супернатант розводять водою очищеною в 10 разів, доводять рН до 7,0, після чого до розчину додають формалін. Суміш перемішують і титрують потенціометрично до рН 9,1 за допомогою 0,1М розчину NaOH. Визначають вміст амінного азоту в мг %.

Карта постадійного контролю

Таблиця 7.4.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
ДР 1.1 Подача азоту К _т	азот після проходження очищувача ступінь очищення	згідно з паспортом очищувача	після проходження через очищувач	E = 95 %
ДР 1.2 Очищення азоту в індивідуальних фільтрах К _т	азот після проходження індивідуального фільтра ступінь очищення	згідно з паспортом фільтра	після проходження через фільтр	E = 99,99 %
ДР 2.1 Приготування та стерилізація 4М розчину їдкою натру на весь виробничий біосинтез К _х , К _т , К _м	розчин їдкою натру концентрація, тиск, час, стерильність	визначення концентрації за оксалатною кислотою з фенолфталеїном, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація – після приготування розчину, тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	P = 0,15 МПа t = 40 хв стерильність
ДР 3.1.1, 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	композиція А тиск, час, стерильність	манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після	P = 0,05 МПа t = 30 хв стерильність

К _Т , К _М			стерилізації	
ДР 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б К _Т , К _М	композиція Б тиск, час, стерильність	манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	P = 0,15 МПа t = 60 хв стерильність
ДР 3.2.2, 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б К _Т , К _М	композиція Б температура, тиск, час, стерильність	датчик температури, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	t° = 131 °C P = 0,15 МПа t = 40 хв стерильність
ДР 3.3.1, 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції А К _Т , К _М	композиція А температура, частота обертання мішалки, час стерилізації, тиск, стерильність	датчик температури, тахометр, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура – безперервно під час розчинення та стерилізації, частота обертання мішалки – безперервно під час розчинення, тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	t° (розчинення) = 40 °C n = 50 об/хв P = 0,05 МПа t° = 112 °C t = 30 хв стерильність

ДР 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б К _Т , К _М	композиція Б температура, частота обертання мішалки, час стерилізації, тиск, стерильність	датчик температури, тахометр, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура – безперервно під час розчинення та стерилізації, частота обертання мішалки – безперервно під час розчинення, тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	t° (розчинення) = 40 °C n = 50 об/хв P = 0,15 МПа t° = 131 °C t = 30 хв стерильність
ТП 4.1 Підтримання колекційної культури К _Т , К _М	колекційна культура <i>Bifidobacterium adolescentis</i> МС-42 температура,	датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура – безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль – кожні 3-4 місяці	t° = 2-8 °C мікробіологічна чистота

	мікробіологічна чистота			
ТП 4.2 Одержання робочої культури К _Т , К _М	робоча культура <i>Bifidobacterium adolescentis</i> МС-42 в пробірках температура, час, мікробіологічна чистота	датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура – під час вирощування в термостаті, мікробіологічний контроль – після вирощування	t° = 37±1 °С t = 48 год мікробіологічна чистота
ТП 4.3 Вирощування інокуляту в колбі К _Т , К _М	посівний матеріал температура, час, мікробіологічна чистота	датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура контролюється під час культивування, мікробіологічний контроль – після культивування	t° = 37±1 °С t = 8 год мікробіологічна чистота
ТП 4.4, 4.5 Вирощування культури в посівних апаратах об'ємом 7 л і 70 л К _Т , К _М	посівний матеріал температура, час, рН, витрата азоту, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота	датчик температури, годинник, датчик рН, ротаметр, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, рН, витрата азоту, швидкість перемішування підтримується автоматично, мікробіологічний контроль – кожні 2 год і після культивування	t° = 37±1 °С t = 18 год рН = 6,8–7,3 v = 0,5 л/(л*хв) n = 70 хв ⁻¹ мікробіологічна чистота
ТП 5.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 250 л К _Т , К _М	культуральна рідина температура, час, рН, витрата азоту, швидкість перемішування, кількість клітин, мікробіологічна чистота	датчик температури, годинник, датчик рН, ротаметр, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, рН, витрата азоту, швидкість перемішування підтримується автоматично, кількість клітин і мікробіологічний контроль – кожні 2 год і після культивування	t° = 37±1 °С t = 18 год рН = 6,8-7,3 v = 0,5 л/(л*хв) n = 70 хв ⁻¹ N = 10 ⁹ КУО/см ³ на кінець культивування мікробіологічна чистота

ВИСНОВКИ

1. В результаті здійсненого пошуку продуцента з потрібними нам властивостями (продукування найбільшої кількості біомаси за найкоротший термін) ми зупинили свій пошук на продуценті *Bifidobacterium adolescentis* МС-42. Продуцент також має властивість накопичувати як в клітинах так і в культуральній рідині волютин, білково-полісахаридний комплекс, лужну протеазу, декстрин азу. Та окрім цього дана біфідобактерія продукує специфічні ферменти : арабінфурангідролазу, альфа галактозу, протеїназу. Все це відіграє важливі процеси в ШКТ, пришвидшує інтенсифікацію процесів метаболізму, що допомагає отримати кращий антагоністичний ефект стосовно патогенних мікроорганізмів. Цей момент відіграє ключову роль і робить даний препарат покращеним дешевшим аналогом препарату «Біфідумбактерин»

2. Встановлено оптимальні умови культивування та обрано максимально найдешевше поживне середовище для культивування даного виду біфідобактерій в максимальній кількості живих клітин (10^{10} - 10^{11} КУО/мл).

3. Розроблено технологічну та апаратурну схему для культивування *Bifidobacterium adolescentis* МС-42 в найбільшій кількості за найменшу собівартість.

4. Технологічний процес біосинтезу культуральної рідини *Bifidobacterium adolescentis* МС-42 складається з допоміжних (підготовка інертного газу, приготування і стерилізація титрувального агента та поживних середовищ) та основних робіт (вирощування інокуляту у спеціальних флаконах для анаеробів та посівних апаратах об'ємами 5 л, 60 л, а також виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 200 л.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Старовойтова С.О. Технологія пробіотиків : підручник / Старовойтова С.О., Скроцька О.І., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П.. – К.: НУХТ, 2012. – С. 318 (с. 79, 105,130, 137, 142,148, 149, 152, 298,299, 301).
2. Біфідумбактери-Біофарма [Електронний ресурс] // Режим доступу:[https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[9283\]](https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[9283])
3. Пирог, Т.П. Становлення та розвиток мікробіології / Т.П. Пирог // Загальна мікробіологія : підручник. - 2 вид., доп. і перероб. – Київ : НУХТ, 2010. – С 632 (с. 425-428)
4. Патент Росії на винахід RU 2 264 456 С1. Биопрепарат-пробиотик бифидин для лечения инфекционных заболеваний и дисбиозов различной этиологии и способ лечения инфекционных болезней и дисбиозов различной этиологии / Поспелова В.В., Ворошилина Н.Н., Грачева Н.М. Опубл. 20.11.2005
5. D'Aimmo, M., Mattarelli, P., Biavati, B., Carlsson, N. and Andlid, T. The potential of bifidobacteria as a source of natural folate // Journal of Applied Microbiology. – 2012. – Vol.112. – P. 975-984. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05261 .
6. Kaprelyants, Leonid and Trufkati, Liudmyla and Pozhitkova, Liliia and Shpyrko, Tetiana and Shvets, Nataliya, Biotechnological Aspects of Obtaining Fermented Soybean Products With Increased Phytoestrogenic Activity // Eastern-European Journal of Enterprise Technologies. – 2020. – Vol.3, № 11(105). – P. 77-88. DOI: 10.15587/1729-4061.2020
7. Патент Росії на винахід RU 2451735 С2. Штам *Bifidobacterium adolescentis* 79-84, используемый для получения биодосодержащей продукции / Левченко Т. О., Ляная А.М. Опубл. 27.05.2012
8. Jung D.H., Kim G.Y., Kim I.Y., Seo D.H., Nam Y.D., Kang H., Song Y., Park C.S. Bifidobacterium adolescentis P2P3, a Human Gut Bacterium Having Strong Non-Gelatinized Resistant Starch-Degrading Activity // J MicrobiolBiotechnol – 2019. – Vol.28, 29, № 12. – P. 1904-1915. DOI: 10.4014/jmb.1909.09010. PMID: 31635446..

9. Laktin M, Laktin V, Alyoskin V. Lectin and enzyme relationships in microbiology // *brichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology*. – 2011. – Vol.1, №1. – P. 10-14.
10. Про погодження методик визначення біологічних речовин: МОЗ України від 28.01.2004 №4 / *ZakonOnline* – 2004. Режим доступу : https://zakononline.com.ua/documents/show/127033_127033
11. Полтавська, О. Біфідобактерії і їх біологічні властивості / О. Полтавська, Н. Коваленко // *Мікробіологія і біотехнологія*. – 2008. – N 1(2). - С. 8-17 – Режим доступу : DOI : 10.18524/2307-4663.2008.1(2).103689
12. Полтавська О. А. Біологічні властивості біфідобактерій, ізольованих з різних природних джерел. УДК 57.017:579.873+001.814, Інститут мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України , Київ – 2006. С. 3
13. Старовойтова, С. О. Пробиотики – промотори життя ХХІ століття / С. О. Старовойтова, В. Ю. Горчаков . *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. - 2006. - № 2. - С. 104-114.
14. Хижняк О.С. Розробка складу та біотехнології отримання комплексного пробіотичного препарату. УДК 615.246; 615.331; 615.451; 615.453. Харків – 2016. – С. 204 (34 - 42)
15. Лях В. Р. Пробиотики як сучасні превентивні препарати захворювань шлунково-кишкового тракту / В. Р. Лях, В. Г. Червецова, А. М. Кричковська // *Chemistry, Technology and Application of Substance*. — Lviv : LvivPolitechnicPublishingHouse, 2018. — Vol 1. — No 1. — P. 72–77.
16. Статистичний щорічник України 2019 рік. Державна служба статистики України. – Київ 2020. – С. 463 (С. 135) Режим доступу: http://ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2020/zb/11/zb_yearbook_2019.pdf
17. Діти, жінки та сім'я в Україні. Статистичний збірник. Державна служба статистики України. – Київ 2020. – С. 284 (С. 134). Режим доступу: http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2020/zb/09/DJS_2019_pdf.pdf
18. *Compendium.com.ua* [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://compendium.com.ua/dec/264586/>

19. Патент Росії на винахід RU 2160594 С1. Способ получения Бифидумбактерина / Храмцов А.Г., Виноградская С.Е. Оpubл. 20.12.2000
20. Чухрай І.Л. Оптимізація фармацевтичного з840 3492 6805 код - 1234абезпечення пробіотиками. Дис. канд.. фарм. наук. Львів – 2021. 245 с
21. Черепанський, В. В., Грегірчак, Н. М. (2019). Збереження життєздатності клітин як запорука якості пробіотичних препаратів / Наукові праці НУХТ том 25 №6. - Київ 2019. - С. 7 – 14
22. Патент Росії на винахід RU 2 264 456 С1. Биопрепарат-пробиотикбифидин для лечения инфекционных заболеваний и дисбиозов различной этиологии и способ лечения инфекционных болезней и дисбиозов различной этиологии / Поспелова В.В., Ворошилина Н.Н., Грачева Н.М.Оpubл. 20.11.2005
23. Патент Росії на винахід RU 2287572 С2. Питательная среда для культивирования Бифидо- и Лактобактерий/Марьин В.А., Райдна Е.И.Оpubл. 20.11.2006
24. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник/ М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. - С. 252 (с. 54).
25. Бардадым В.Ю. Что важнее: Высокая эффективность НЕРА-Фильтров или их производительность?// Инновационная наука. 2021. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/chto-vazhnee-vysokaya>
26. Балон з інертним газом [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://ballon.com.ua/ua/p581709285-ballon-dlya-azota.html>
27. В. Ф. Кохан. Фізико-хімічні явища при очищенні робочих поверхонь змивними розчинами/ Наукові записки (Українська академія друкарства) – 2012 - 1(38) – С. 181-183
28. Інструкція по застосуванню деззасобу «Бриліант»/ [Електронний ресурс]: Режим доступу http://www.dealmed.ru/files2/instrukciya_po_primeneniu_brilliant_klassik.pdf
29. Грегірчак Н.М. Мікробіологія, санітарія і гігієна виробництв з основами НАССР [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освіт. ступ.

38. Інокулятор для вирощування посівного матеріалу об'ємом 60 л [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://xn--80ac2aleg3a.xn--p1ai/catalog/fermentery-bioreaktory/biostat-cultibag-str/>
39. Реактор-змішувач для приготування і стерилізації [Електронний ресурс] // Режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ru/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ru.php
40. Ферментер для виробничого біосинтезу [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.bioprocess-eng.co.uk/wp-content/uploads/2019/02/M-SERIES_LD.pdf
41. Pompei A, Cordisco L, Amaretti A, Zanoni S, Matteuzzi D, Rossi M. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Jan;73(1):179-85. doi: 10.1128/AEM.01763-06. Epub 2006 Oct 27. PMID: 17071792; PMCID: PMC1797147
42. Pompei A, Cordisco L, Amaretti A, Zanoni S, Matteuzzi D, Rossi M. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Jan;73(1):179-85. doi: 10.1128/AEM.01763-06. Epub 2006 Oct 27. PMID: 17071792; PMCID: PMC1797147
43. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія і вірусологія: лабораторний практикум для студ. освітнього ступеня «Бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми навч. / уклад. Пирог Т.П., Антонюк М.М. – К.: НУХТ, 2020. – 126 с.
44. Пешкова В.М. Ферментний кондуктометричний біосенсор для визначення лактози // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 4.
45. Хижняк О. С. Розробка складу та біотехнології отримання комплексного пробіотичного препарату : дисертація канд. фармацевт. наук. Нац. фармацевт. ун-т. - Харків, 2017. - 204 с.