

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

« » червень 2021 р.

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 «Біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

“ 01 ” квітня 20 21 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Зомчак Вікторія Василівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання біомаси *Saccharomyces boulardii* для виробництва пробіотичного препарату «Ентерол»

керівник роботи Грегірчак Наталія Миколаївна, к.т.н., доцент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2021 року № 228-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 28.05.2021

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Saccharomyces boulardii*, цільовий продукт: біомаса дріжджів, пробіотичний препарат «Ентерол».

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва. РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва -2 аркуша формату А1. Апаратурна схема виробництва – 2 аркуша формату А1. Схема ділянки автоматизації виробничого біосинтезу біомаси дріжджів *Saccharomyces boulardii* – 1 аркуш формату А3

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 9. Автоматизація ділянки виробництва	Клименко О.М., доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління		

7. Дата видачі завдання 01 квітня 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту.	01.04.2021-05.04.2021	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	06.04.2021-13.04.2021	
3	Техніко-економічне обґрунтування	14.04.2021-18.04.2021	
4	Біосинтез цільового продукту	19.04.2021-21.04.2021	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	22.04.2021-02.04.2021	
6	Специфікація обладнання	03.05.2021-06.05.2021	
7	Опис технологічної схеми	07.05.2021-16.05.2021	
8	Контроль виробництва	17.05.2021-21.05.2021	
9	Автоматизація ділянки виробництва	22.05.2021-24.05.2021	
10	Охорона довкілля	25.05.2021-27.05.2021	
11	Оформлення пояснювальної записки	01.04.2021-28.05.2021	
12	Виконання графічної частини проекту	07.05.2021-28.05.2021	

Здобувач _____
(підпис)

Зомчак В.В. _____
(прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____
(підпис)

Грегірчак Н.М. _____
(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт присвячено розробленню біотехнології виробництва пробіотичного препарату на основі біомаси дріжджів *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796. «Ентерол» - антидіарейний і протимікробний препарат на основі біомаси *S. boulardii* з групи пробіотиків, направлений на регуляцію чисельності мікрофлори кишечника. Розрахована потужність виробництва біомаси *S. boulardii* для одержання пробіотику складає 202,18 кг.

Технологія виробництва препарату «Ентерол» передбачає виконання допоміжних робіт: підготовка повітря (вентиляційне та аераційне), санітарна підготовка виробництва, яка включає в себе підготовку персоналу, приміщень, обладнання, приготування мийно-дезінфікуючих розчинів, підготовка піногасника, титрувальних агентів, приготування та стерилізація поживних середовищ, а також приготування захисного середовища. До технологічного процесу відносять підготовку посівного матеріалу для культивування в колбах на качалці, в 25 л посівому апараті, а також біосинтез у ферментері об'ємом 250л з коефіцієнтом заповнення 0,6 та стадії відділення біомаси центрифугуванням, змішування з захисним середовищем, сублімаційним висушування біомаси, подрібнення на молотковому млині та просіювання на віброситі. Пакування (фасування по 250 мг, первинна упаковка у саше, вторинна упаковка у коробки, упаковка готового продукту в гофрокороб), маркування та відвантаження, а також знешкодження відходів.

Дипломний проєкт викладений на 142 стор. друкованого тексту, містить 14 таблиць, 14 рисунків і складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (163 джерела), графічної частини (2 технологічні схеми формату А1, 2 апаратурні схеми формату А1 та схема автоматизації виробництва формату А3), а також додатки.

Ключові слова: пробіотик, *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796, «Ентерол», біомаса, дріжджі.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	8
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	11
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	11
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	19
2.3. Таксономічний статус біологічного агента	21
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	21
3.1. Потреба у цільовому продукті	21
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	27
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	28
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	30
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	33
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	33
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	35
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	37
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу....	37
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	37
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	42
5.1.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	43
5.1.3.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	43
5.1.3.2 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виращування інокуляту в посівному апараті	44
5.1.3.3 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу.....	45
5.1.4. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника	46

5.2.	Обґрунтування стадій виділення цільового продукту	48
5.2.1.	Вибір способу відділення біомаси та відповідного обладнання	48
5.2.2.	Вибір захисного середовища.....	52
5.2.3.	Вибір способу сушіння та сушарки	53
5.2.4.	Вибір способу подрібнення та подрібнювача	56
5.2.5.	Вибір способу просіювання та просіювача	58
5.2.6.	Пакування, маркування та відвантаження	59
5.3.	Обґрунтування фармацевтичної складової проєкту	60
5.3.1.	Обґрунтування вибору «чистих» приміщень	45
5.3.2.	Обґрунтування підготовки вентиляційного повітря	45
5.3.3.	Обґрунтування водопідготовки	63
5.3.4.	Обґрунтування вибору миючих та дезінфікуючих засобів	64
5.4.	Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	70
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ		73
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....		77
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА		103
8.1.	Карта постадійного контролю доферментаційних процесів	103
8.2.	Мікробіологічний контроль	108
8.3.	Показники росту і синтезу цільового продукту	110
8.3.1.	Концентрація біомаси	110
8.3.2.	Концентрація джерела Карбону та Нітрогену.....	110
8.4.	Показники якості готового продукту	112
8.4.1.	Зовнішній вигляд препарату пробіотика Ентерол	112
8.4.2.	Автентичність препарату пробіотика Ентерол	112
8.4.3.	Фізико-біохімічні характеристики препарату пробіотика Ентерол.....	113
8.4.3.1	Розчинність препарату пробіотика Ентерол.....	111
8.4.3.2	Прозорість препарату пробіотика Ентерол	111
8.4.3.3	Кольоровість препарату пробіотика Ентерол	111
8.4.3.4	pH препарату пробіотика Ентерол.....	111

8.4.3.5 Втрата в масі при висушування препарату пробіотики Ентерол	111
8.4.4. Специфічна нешкідливість препарату пробіотики Ентерол	113
8.4.5. Мікробіологічна чистота	114
8.4.6. Контроль кількості життєздатних клітин в одній дозі препарату	115
8.4.7. Специфічна активність	115
8.4.8. Термін придатності	116
РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА	117
9.1 Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки з формуванням завдання на розробку системи автоматизації	117
9.2 Опис схеми автоматизації з специфікацією засобів автоматизації	121
РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	125
10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердин, рідких та газоподібних відходів	125
10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва	125
10.2.1 Системи знешкодження та утилізації рідких відходів	125
10.2.2 Системи знешкодження та утилізації твердих відходів	126
10.2.3. Системи знешкодження та утилізації газоподібних відходів	128
10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів	129
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	130

ВСТУП

Актуальність проєкту.

Фактори навколишнього середовища є важливими посередниками багатьох захворювань органів травлення. В наш час структура харчування у розвинених країнах характеризується незбалансованістю за складом нутрієнтів, вітамінів, мікроелементів, харчових волокон, підвищеним вмістом антибактеріальних компонентів, консервантів, стабілізаторів, гормонів, нерегулярністю, різкими змінами раціонів і режимів харчування [1].

Також істотний внесок у парадигму сучасної захворюваності привело широке використання антибактеріальних засобів. Антибіотики відіграють позитивну роль у боротьбі з інфекційними захворюваннями, але мають побічні ефекти, які викликають хвороби ШКТ [2].

Для лікування різних кишкових захворювань використовують пробіотичні препарати. Вони формують мікробіоту кишечника, тобто нормалізують склад і функції мікрофлори шлунково-кишкового тракту (ШКТ) [2], що веде до потенційного контролю множинних захворювань органів травлення та сприяє загальному самопочуттю [3].

Пробіотики – живі мікроорганізми, які позитивно впливають на здоров'я людини [2]. На відміну від ліків, пробіотики можуть бути корисними для здорових осіб для зменшення ризику розвитку певних захворювань або для оптимізації деяких фізіологічних функцій. Вони також можуть застосовуватись для вже хворих людей у полегшенні симптомів та ознак [4].

Наявність у пробіотиків високої антагоністичної активності щодо умовно-патогенних бактерій і помірно виражений рівень адгезивної активності є необхідними чинниками, що забезпечують порівняно швидке якісне і кількісне відновлення популяції аутофлори пацієнта.

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ	Лім.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Зомчак В.В					6	142
Перевір.		Грегірчак Н.М.						
Консультант								
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ 8		

Тому вивчення сучасних пробіотичних препаратів, які могли би покращити стан ШКТ, є проблемою актуальною [2].

Пробіотики підтримують імунологічну рівновагу в ШКТ завдяки безпосередній взаємодії з імунними клітинами. Є високоякісні докази того, що пробіотики ефективні при типах діареї, печінкової енцефалопатії, виразковому коліті, синдромі подразненого кишечника, функціональних шлунково-кишкових розладах та некротизуючому ентероколіті [5].

До найбільш вивчених видів пробіотиків, які впливають на різні шлунково-кишкові захворювання є біфідобактерії та молочнокислі бактерії, такі як лактобактерії, лактококи та стрептококи. До мікроорганізмів, які є пробіотиками для людини, також належать дріжджі, бацили та ентерококи [5,6].

Пробіотичні дріжджі стали цікавими для науковців останніми роками. Дослідження показали, що представники роду *Saccharomyces* можуть володіти антибактеріальними та пробіотичними властивостями [6].

Представником цього роду дріжджів є *Saccharomyces boulardii* - єдині пробіотичні дріжджі, які отримали схвалення США з контролю за продуктами харчування та ліками. Це непатогенні дріжджі, що застосовуються протягом багатьох років як пробіотичний засіб для запобігання, або лікування різних шлунково-кишкових розладів людини. *S. boulardii* ATCC-MYA-796 зазвичай використовується в ліофілізованій формі, під торговою маркою «Ентерол» [6, 7, 8].

Отже, **новизною даної роботи** є реалізація технології накопичення біомаси високопродуктивного штаму пробіотичних дріжджів *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796, який має суттєву перевагу перед іншими – в процесі росту накопичує біомасу (8,2 г/л), рівень якої у 2 рази вище за показники інших штамів, а також підбір поживного середовища для їх культивування, беручи до уваги фізіологічні особливості продуцента, з урахуванням річної потреби у цільовому продукті.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

«Ентерол» - це препарат біологічного виробництва, до складу якого входять ліофілізовані *Saccharomyces boulardii* [8].

«Ентерол» - антидіарейний і протимікробний препарат з групи пробіотиків, направлений на регуляцію чисельності мікрофлори кишечника. Призначають його пацієнтам з інфекційною діареєю, діареєю мандрівників, дисбактеріозом, синдромом подразненого кишечника і колітом [9].

Saccharomyces boulardii проявляє вибірккову дію, впливаючи лише на окремі порушення нормальної мікрофлори. Доведена протизапальна дія цього пробіотичного штаму, яка досягається завдяки його здатності пригнічувати синтез прозапальних медіаторів [10].

Пробіотик «Ентерол» активно бере участь у травленні, підвищуючи ферментативну функцію кишечника за рахунок збільшення активності лактази, сахарозо-альфа-глюкозидази і мальтази кишкового епітелію, володіє імунотехнічною активністю (стимулює вироблення секреторного IgA) і покращує трофічні процеси в кишечнику за рахунок збільшення синтезу поліамінів [11].

Йому притаманні всі властивості, якими має володіти сучасний пробіотик:

- прямий антагонізм (антимікробна дія), зумовлений здатністю *Saccharomyces boulardii* пригнічувати ріст патогенних й умовнопатогенних мікроорганізмів і грибів, що порушують біоценоз кишечника, таких як: *Clostridium difficile*, *Clostridium pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Vibrio cholerae*, а також *Entamoeba histolytica*, *Lamblia*; *Enterovirus*, *Rotavirus*;

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Зомчак В.В.						8	142
Перевір.	Грегірчак Н.М.							
Консультант								
Н.Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.					Кафедра БТМ 10		

- антитоксична дія зумовлена продукуванням протеаз, що розщеплюють токсин та рецептор ентероцита, з яким зв'язується токсин (особливо відносно цитотоксину А, *Clostridium difficile*);

- антисекреторна дія зумовлена зниженням цАМФ в ентероцитах, що призводить до зменшення секреції води та натрію в просвіт кишечника;

- підсилення неспецифічного імунного захисту за рахунок підвищення продукції IgA та секреторних компонентів інших імуноглобулінів;

- ферментативна дія зумовлена підвищенням активності дисахаридаз тонкого кишечника (лактази, сахарази, мальтази);

- трофічний ефект відносно слизової оболонки тонкої кишки спостерігається за рахунок визволення сперміну та спермідину.

Генетично зумовлена стійкість *Saccharomyces boulardii* до антибіотиків обґрунтовує можливість їх одночасного застосування з антибіотиками для захисту нормального біоценозу травного тракту [10,12].

Склад пробіотику:

- діюча речовина: 1 пакетик містить *Saccharomyces boulardii* (ліофілізовані клітини) 250 мг;
- допоміжні речовини: лактози моногідрат, фруктоза, кремнію діоксид колоїдний безводний, смакова добавка «тутті фрутті».

Лікарська форма. Порошок для орального застосування.

Основні фізико-хімічні властивості: порошок світло-коричнюватого кольору з характерним фруктовим запахом.

Фармакотерапевтична група

Антидіарейні мікробні препарати.

Сахароміцети буларді. Код АТС А07F А02 [12].

Фармакологічні властивості

Фармакодинаміка

«Ентерол» нормалізує мікрофлору кишечника й має виражену етіопатогенетичну антидіарейну дію. Під час проходження через шлунково-

кишковий тракт *Saccharomyces boulardii* чинять біологічну захисну дію відносно нормальної кишкової мікрофлори.

Фармакокінетика

Після прийому препарату швидко досягається висока концентрація *Saccharomyces boulardii* у товстому кишечнику, яка підтримується протягом 24 годин. *Saccharomyces boulardii* не проникають у системний кровотік і мезентеріальні лімфатичні вузли. Після закінчення лікування *Saccharomyces boulardii* повністю виводяться з калом протягом 3-5 днів [13].

Клінічні характеристики

Показання.

- Профілактика та лікування колітів і діареї, пов'язаних з прийомом антибіотиків.
- Дисбіоз кишечника.
- Гостра та хронічна бактеріальна діарея.
- Гостра вірусна діарея.
- Синдром подразненого кишечника.
- Діарея мандрівника.
- Псевдомембранозний коліт і захворювання, зумовлені *Clostridium difficile*
- Діарея, пов'язана з довгостроковим ентеральним харчуванням [14].

Протипоказання.

Гіперчутливість до будь-якого компонента препарату. Препарат протипоказаний пацієнтам зі встановленим центральним або периферійним венозним катетером; пацієнтам, які перебувають на лікуванні у відділенні інтенсивної терапії; імунокомпрометованим пацієнтам, таким як: ВІЛ-інфіковані, онкологічні хворі, з трансплантованим органом, які отримують хіміо-та/або променеви терапію та/або тривало високі дози кортикостероїдів [12, 14].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Пробіотики – це живі мікроорганізми або мікробні суміші, які застосовуються для поліпшенні мікробного балансу пацієнта [15].

На фармацевтичному ринку України пробіотики представлені доволі широко. Переважно це препарати, які містять біфідо-, колі- та лактобактерії, а також дріжджі. На сьогодні широкому колу споживачів доступні сотні пробіотичних продуктів харчування, харчові добавки, та їх кількість, зареєстрованих в Україні, постійно зростає. В наш час на українському ринку лікарських препаратів переважають імпорتنі пробіотики. Закордонні фірми займають біля 90% українського фармацевтичного ринку в цій області [16].

Найбільш поширені є пробіотики на основі лактобацил і біфідобактерій. Недоліком цих пробіотиків є недостатня їх ефективність та загроза в ослабленому організмі спричиняти побічні впливи: алергії, фунгемії [17].

Принциповими відмінностями пробіотиків на основі живих дріжджів порівняно з бактеріальними препаратами є:

1) бактеріальні пробіотики діють шляхом конкурентного витіснення патогенів, інтенсивно розмножуючись і колонізуючи кишечник, а дріжджі виділяють ряд мікронутрієнтів, що стимулюють розвиток власної корисної мікрофлори, а також посилюють синтез організмом антитіл;

2) завдяки особливій структурі клітинної стінки, дріжджі здатні адсорбувати на своїй поверхні й виводити з організму мікотоксини й патогени, а бактеріальні пробіотики не мають такої здатності;

3) будь-які бактеріальні пробіотики чутливі до дії антибіотиків, дріжджі не чутливі до антибіотиків і можуть застосовуватися в комбінованих програмах

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Лім.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Зомчак В.В.					11	142
Перевір.		Грегірчак Н.М.						
Консультант								
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ 13		

профілактики захворювань.

Все більшого поширення для лікування затяжного діарейного синдрому використовують дріжджі *Saccharomyces boulardii*, ефективність яких була доведена численними науковими працями *in vivo* та *in vitro*, рандомізованими подвійними сліпими випробуваннями. Олігосахариди клітинної стінки дріжджів запобігають колонізації кишечника патогенними мікроорганізмами та посилюють імунний захист. Існує ряд препаратів на основі *S. boulardii*, що підтримують і поновлюють флору шлунково-кишкового тракту [17].

Аналіз пробіотиків які є на фармацевтичному ринку на основі дріжджів *S. boulardii* наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Пробіотики на основі біомаси *Sacchchromyces boulardii*

Назва пробіотики	Назва культура	Вміст мікроорганізмів у дозі, КУО	Виробник	Використана література
Ентерол 250	<i>Sacchchromyces boulardii</i>	$5 \cdot 10^9$	BIOCODEX, Франція	[12]
Sacro-B	<i>Sacchchromyces boulardii</i>	$5 \cdot 10^9$	Thorne Research, США	[18]
<i>Sacchchromyces boulardii</i> + MOS	<i>Sacchchromyces boulardii</i>	$5 \cdot 10^9$	Jarrow Formulas, США	[19]
<i>Sacchchromyces boulardii</i>	<i>Sacchchromyces boulardii</i>	$10 \cdot 10^9$	Now Foods, США	[20]
<i>Sacchchromyces boulardii</i>	<i>Sacchchromyces boulardii</i>	$8 \cdot 10^9$	Zhou Nutrition, США	[21]
Spectrumceuticals SB 250	<i>Sacchchromyces boulardii</i>	$5 \cdot 10^9$	Spectrum, Іспанія	[22]
<i>Sacchchromyces boulardii</i>	<i>Sacchchromyces boulardii</i>	$8 \cdot 10^9$	KAL, США	[23]
<i>Sacchchromyces boulardii</i>	<i>Sacchchromyces boulardii</i>	$3 \cdot 10^9$	Klaire Labs, США	[24]

На основі даних *табл. 2.1* можна зробити висновок, що пробіотики на основі *Saccharomyces boulardii* випускаються в основному закордонними виробниками (здебільшого США). Отже, виробництво пробіотика «Ентеролу», який у своєму складі містить дріжджі *Saccharomyces boulardii* є актуальним на фармацевтичному ринку України.

При виборі біологічного агента потрібно враховувати концентрацію біомаси, ціну та склад поживного середовища, а також тривалість культивування.

У *табл. 2.2* наведено узагальнена інформація щодо біологічних агентів для отримання пробіотика «Ентеролу» на основі біомаси *Saccharomyces boulardii*.

Таблиця 2.2

**Особливості одержання пробіотика «Ентеролу» за допомогою
Saccharomyces boulardii RC009, *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 та
Saccharomyces boulardii SB2.**

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація клітин, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
<i>Saccharomyces boulardii</i> RC009	YPD бульйон: Пептон, 20; Дріжджовий екстракт, 10; Декстроза, 20.	24 год	4,02 г/л	T = 30°C. pH 6,5	[25]
<i>Saccharomyces boulardii</i> ATCC-MYA-796	глюкоза, 20,0; кукурудзяний екстракт, 15,0; NaNO ₃ , 1,0; KH ₂ PO ₄ , 6,0; MgSO ₄ · 7H ₂ O, 3,0; CuSO ₄ · 5H ₂ O, 0,002; FeSO ₄ · 7H ₂ O, 0,001; ZnSO ₄ · 7H ₂ O, 0,01.	16 год	8,2 г/л	T = 37°C. pH 5,5	[26]

<i>Saccharomyces boulardii</i> SB2	Середовище УМ: Глюкоза – 10,0; Пептон – 5,0; Дріжджовий екстракт – 3,0; Солодовий екстракт – 3,0.	32 год	3,58 г/л	Т = 37°C, рН 6	[27]
---------------------------------------	--	--------	----------	-------------------	------

Аналіз літературних джерел показав, що найвищий показник синтезу біомаси досягається при вирощуванні штаму *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 (8,2 г/л), який є значно більшим порівняно з штамми *Saccharomyces boulardii* SB2 та *Saccharomyces boulardii* RC009 – лише 3,58 г/л та 4,02 г/л біомаси відповідно.

Тривалість культивування також є важливим показником при виборі біологічного агента. Штам *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 культивують протягом 16 год, *Saccharomyces boulardii* RC009 – 24 год, а найбільше часу для культивування необхідно *Saccharomyces boulardii* SB2 – 32 год.

Проте така характеристика технологічного процесу є недостатньою для вибору певного біологічного агента. Тому на наступному етапі вибору порівнюємо вартість поживних середовищ для культивування продуцентів (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Вартість компонентів поживного середовища для культивування *Saccharomyces boulardii* RC009, *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 та *Saccharomyces boulardii* SB2.

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн./кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації (1,2,3,4, 5,6,7)*
<i>Saccharomyces boulardii</i> RC009	Пептон, 20	750	15	1
	дріжджовий екстракт, 10	1632	16,32	2
	Декстроза, 20	60	1,2	3

	Вартість 1 л середовища – 32,52 грн			
<i>Saccharomyces boulardii</i> ATCC-MYA-796	глюкози, 20,0;	28,2	0,56	1
	кукурудзяний екстракт, 15,0;	25	0,3	4
	$NaNO_3$, 1,0;	60	0,06	3
	KH_2PO_4 , 6,0;	55	0,33	5
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3,0;	65	0,195	3
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,002;	85	0,00017	3
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001;	2,8	0,0000028	6
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01.	80	0,0008	3
	Вартість 1 л середовища – 1,459728 грн			
<i>Saccharomyces boulardii</i> SB2	Середовище YM: Глюкоза-10,0;	28,2	0,282	1
	Пептон-5,0;	750	3,75	1
	Дріжджовий екстракт – 3,0;	1632	4,896	2
	Солодовий екстракт – 3,0.	50	0,15	7
	Вартість 1 л середовища – 9,078 грн			

Примітка. * - Ціни наведено станом на квітень 2020 р.

1. <https://www.systopt.com.ua>
2. <http://agar.com.ua>
3. <https://prom.ua>
4. <https://kiev.flagma.ua>
5. <https://him-component.com.ua>
6. <https://dnepropetrovsk.flagma.ua>
7. <https://kraftbir.com>

Дані, які наведені в табл. 2.3 показують, що поживне середовище для культивування *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 є у 22 та 6,2 рази дешевшим ніж для *Saccharomyces boulardii* RC009 і *Saccharomyces boulardii* SB2 відповідно.

Для коректного вибору біологічного агента проведемо розрахунок умовної вартості 1 г цільового продукту та кількості утвореної біомаси за годину. Ці показники врахують тривалість культивування біологічного агента та її співвідношення з концентрацією цільового продукту (табл. 2.4).

Таблиця 2.4

**Умовна вартість 1 мг цільового продукту (біомаси) при
культивуванні *Saccharomyces boulardii* RC009, *Saccharomyces boulardii*
ATCC-MYA-796 та *Saccharomyces boulardii* SB2**

Біологічний агент	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної біомаси за годину, мг/год	Вартість 1 л середовища, грн	Умовна вартість 1 мг цільового продукту, грн./мг
<i>Saccharomyces boulardii</i> RC009	4,02	24	0,1675	32,52	8,09
<i>Saccharomyces boulardii</i> ATCC-MYA-796	8,2	16	0,513	1,46	0,178
<i>Saccharomyces boulardii</i> SB2	3,58	32	0,079	9,078	2,54

У *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 кількість утвореної біомаси становить 0,513 мг/год, що є майже втричі більше за утворення біомаси штамом *Saccharomyces boulardii* RC009 – 0,168 мг/год, і майже в 7 раз більше ніж у *Saccharomyces boulardii* SB2 - 0,079 мг/год.

Узагальнивши дані можна зробити висновок, що доцільнішим буде використання *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796, оскільки вартість цільового продукту становить 0,178 грн/мг, вартість продукту синтезованого штамом *Saccharomyces boulardii* SB2 - 2,54 грн/мг, а найдорожчим є цільовий продукт отриманий штамом *Saccharomyces boulardii* RC009, що складає 8,09 грн./мг.

Отже, враховуючи відносно недороге поживне середовище, короткий термін культивування та високий рівень накопичення біомаси вибираємо штам

Saccharomyces boulardii ATCC-MYA-796, який є найпродуктивнішим з проаналізованих біологічних агентів для отримання біомаси дріжджів.

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

Дріжджі *S.boulardii* – це овальні клітини, які мають довжину приблизно 10 мкм та ширину 5 мкм [28]. Клітинна стінка дріжджів *S.boulardii* становить приблизно 30% сухої маси клітини і складається переважно з полісахаридів (85%) та білків (15%) [28]. Широкі біохімічні аналізи виявляють, що глюкоза, N-ацетилглюкозамін (GlcNAc) та залишки манози становлять 80-90%, 1-2% та 10-20% загального полісахариду [28].

Дріжджі *S.boulardii* класифікується як анаероби, тобто вони можуть рости в аеробних або анаеробних умовах [29]. Дріжджі *S.boulardii* – гетеротрофи, тобто вони отримують свою енергію з глюкози [29].

Дріжджі *S.boulardii* діють як човник для вивільнення ферментів, білків, трофічних факторів під час кишкового транзиту для поліпшення імунного захисту господаря, травлення та засвоєння поживних речовин [30]. Дріжджі *S.boulardii* здатні виділяти поліаміни (спермін та спермідин) під час кишкового транзиту для регулювання експресії генів і, в свою чергу, синтезу білка [30].

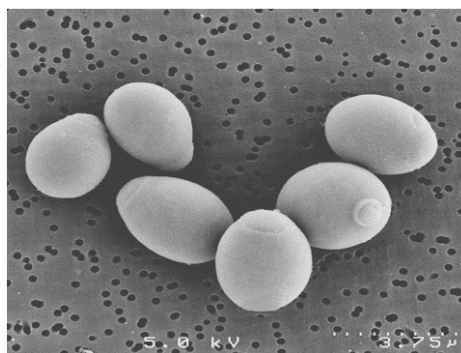


Рис.2.1 Мікроскопія клітин дріжджів *Saccharomyces boulardii*, $\times 1300$

Дріжджі широко поширені в природному середовищі, на рослинах, в повітрі і воді, в харчових продуктах, в лікарських препаратах і в багатьох інших екологічних нішах, включаючи нормальну мікрофлору людини. Дріжджі взаємодіють з іншими мікроорганізмами, включаючи симбіоз, паразитизм і конкуренцію [31].

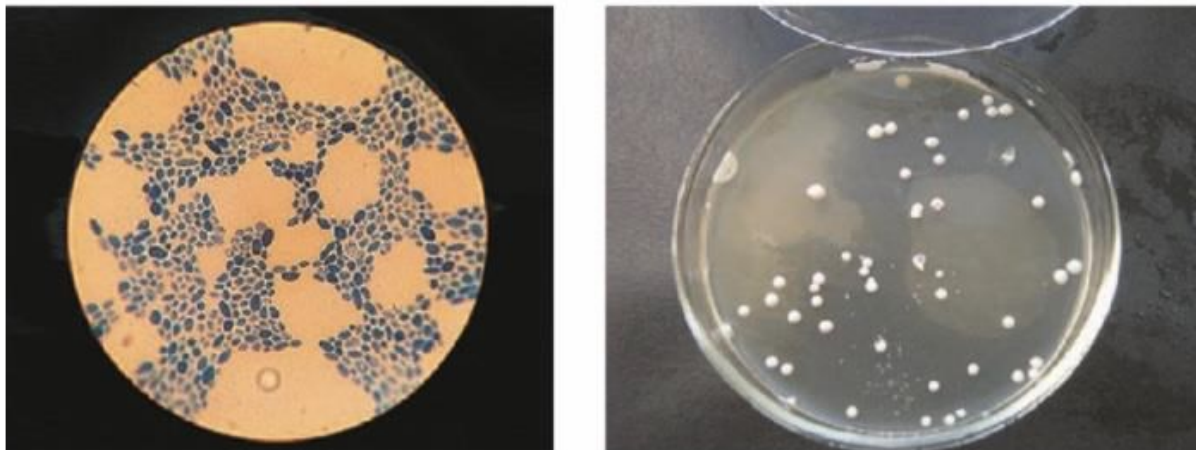


Рис.2.2 Форма клітин та колоній дріжджів виду *Saccharomyces boulardii* на поживному середовищі

Фізіологічні властивості дріжджів *Saccharomyces boulardii* дозволяють широко використовувати їх в лікуванні діареї різної етіології, особливо у дітей, та інших захворювань.

Дріжджі *S.boulardii* належать до класу пробіотиків, основним призначенням яких є боротьба з патогенними мікроорганізмами у кишківнику, мають властивості, що зумовлюють перевагу даних препаратів:

- не колонізують кишківник (через 2-5 днів після припинення прийому препарату їх не виявляють у фекаліях);
- не проникають через кишковий бар'єр;
- мають високу «комфортну» температуру для розмноження порівняно з іншими мікроорганізмами – 37 °С;
- мають високу життєздатність;
- їм властива генетично детермінована антибіотикорезистентність;
- не пригнічують ріст облігатної мікрофлори кишківника.

Дріжджі *S.boulardii* у складі пробіотика – ліофілізовані, їх обробляють шляхом кріодесценації або гарячого висушування. Здатність цих мікроорганізмів до відновлення їх життєздатності визначає фармакодинамічні властивості препарату. При пероральному прийомі ліофілізованої форми дріжджів, вони швидко дістаються шлунково-кишкового тракту у високих концентраціях та залишаються живими до їх виведення з кишківника.

Клітини дріжджів *S.boulardii* зазвичай мають розміри 5-10 х 5-13 мкм, круглу або овальну форму, розмножуються брунькуванням, добре фарбуються метиленовим синім. Дріжджі *S.boulardii* накопичуються на щільних і рідких поживних середовищах при рН 5,4 5,5 і температурі 30 °С, але можуть розмножуватися при більш високій температурі (37 °С), і в більш широкому діапазоні рН.

Дріжджі *S.boulardii*, як і всі представники роду *Saccharomyces*, на щільних поживних середовищах формують великі гладкі опуклі білого або кремового кольору колонії; на рідких середовищах дають легке помутніння і осад. Ці дріжджі ферментують деякі вуглеводи з утворенням кислоти і газу через 24-72 год інкубації при 30 °С. Дріжджі *S.boulardii* володіють унікальними фізіологічними властивостями, такими як толерантність до змін рН, температури і резистентність до кислот, жовчі і ферментів. Вони ростуть при 37 °С, тобто при незвично високій температурі для дріжджів [31].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Дріжджі *Saccharomyces boulardii* – одноклітинні мікроскопічні недосконалі мікроорганізми, що відносяться до роду *Saccharomyces*. Ці мікроорганізми названі на честь французького вченого Анрі Булара, який виділив їх із тропічних плодів в Індокитаї, помітивши, що місцеві жителі використовують ці плоди при розладах травлення. Досліджуючи мікрофлору цих тропічних рослин, вчений виділив чисту культуру дріжджів, які володіли протидіарейними властивостями [32].

Згідно глобальної систематики біологічних видів можемо стверджувати, що дріжджі виду *Saccharomyces boulardii* мають такі таксономічні одиниці, як:

Домен: *Eukaryota*

Царство: *Fungi*

Підцарство: *Dikarya*

Відділ: *Ascomycota*

Клас: *Saccharomycetes*

Підклас: *Saccharomycotina*

Порядок: *Saccharomycetales*

Родина: *Saccharomycetaceae*

Рід: *Saccharomyces*

Вид: *Saccharomyces bulardii* [32].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Погана екологія, погіршення якості їжі, неправильний спосіб життя, спадковість та інші фактори призводять до постійного росту захворюваності на хвороби шлунково-кишкового тракту [33].

Хвороби органів травлення впродовж останнього десятиріччя займають третє місце в загальній структурі захворювань. Медичні аспекти гастроентерологічних захворювань мають велике соціально-економічне значення, оскільки пов'язані з передчасною інвалідизацією і смертністю хворих, особливо працездатного віку [34].

Нині «золотим стандартом» у корекції шлунково – кишкових захворювань є застосування пробіотиків [35].

Їхнє використання частково ґрунтується на гіпотезі про те, що мікроби, що колонізують наш організм, можуть бути не цілком придатні для цього, а значить, додавання «корисних» бактерій у вигляді пробіотиків може позитивно впливати на здоров'я.

З лікувальною метою можуть застосовуватися пробіотики, що містять мікроорганізми - звичайні мешканці кишечника, в першу чергу, біфідо-, колі- та лактобактерії, дріжджі (рис. 3.1), а також мікроорганізми, які в нормі в кишечнику людини не живуть (наприклад, *Bacillus cereus* IP 5832 або *Saccharomyces boulardii*) [36, 37].

Ці препарати можуть бути монокомпонентними, тобто включати тільки один вид мікроорганізмів, або багатокомпонентними. Доведено, що позитивний ефект на кишкову мікрофлору надають такі мікроорганізми: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus GG*, *Lactobacillus fermentum*, *Strepto- (Entero-) coccus faecium* SF68, *Streptococcus termophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, а також непатогенні дріжджові гриби *Saccharomyces boulardii* і деякі інші [36].

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.	Зомчак В.В.				РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування		Лім.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Грегірчак Н.М.							21	142
Консультант				Кафедра БТМ 23					
Н.Контр.									
Затверд.	Пирог Т.П.								

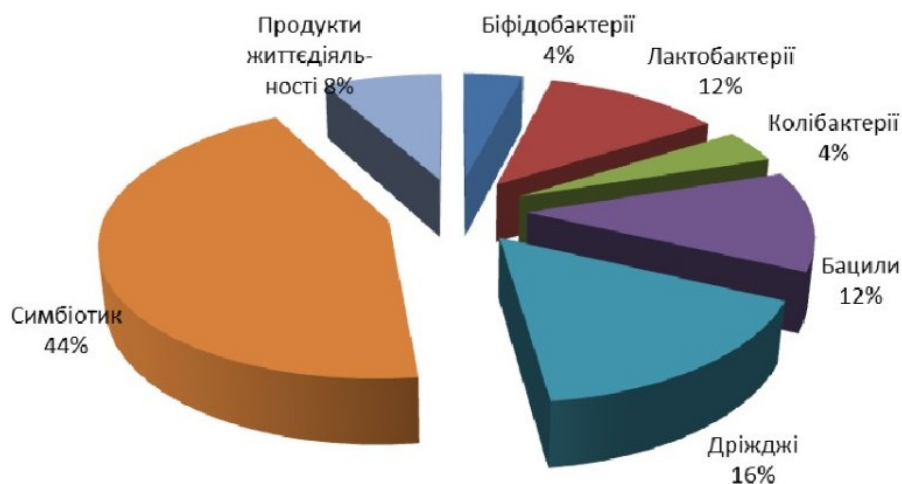


Рис. 3.1. Типи пробіотиків [37]

На сьогоднішній день одними з найбільш досліджуваних пробіотичних засобів в сучасній медицині є препарати на основі *Saccharomyces boulardii*. Високу ефективність цих дріжджів, порівняно з іншими пробіотиками, визначає низка їх унікальних властивостей [36]. *S. boulardii* – непатогенні дріжджові гриби, що відносяться до аскоміцетів. Передусім важливою перевагою цього пробіотика є можливість його застосування паралельно з антибактеріальною терапією [38, 39]. Генетична відмінність дріжджів запобігає можливості переходу плазмід із фактором антибіотикорезистентності до збудників гострих кишкових інфекцій. Крім того, вони мають значний антагоністичний вплив на патогенну та умовно-патогенну флору, що базується на природних властивостях грибів [36].

Після потрапляння до травного каналу сахароміцети починають посилено розмножуватися, оскільки температура 37 °C є оптимальною для їх росту. Кислота шлунку не діє на *S. boulardii*, вони не перетравлюються і в разі щоденного застосування зберігають життєздатність в усіх відділах травної системи. Дріжджі не проникають через кишковий бар'єр, тобто не потрапляють у системний кровообіг та мезентеріальні лімфатичні вузли. До того ж дріжджові гриби не колонізують кишечник і повністю елімінуються через 3-5 днів після припинення лікування [40, 41].

Пробіотичні препарати на основі *S. boulardii* підвищують місцевий імунний захист у результаті активування продукції IgA та інших імуноглобулінів. Антисекреторний ефект за рахунок специфічного впливу на зв'язування бактеріальних токсинів у рецепторах кишечника забезпечує антитоксичну дію препарату, особливо щодо токсинів, які виділяє *Clostridium difficile*, а також ентеротоксинів. Механізм антитоксичної дії *S. boulardii* може бути пов'язаний з виробленням протеаз, здатних розщеплювати ентеротоксини; синтезом протеїнів, що діють на мембранні рецептори; адгезією до ентероцитів; зниженням утворення цАМФ із подальшим зменшенням секреції води. Препарат підвищує активність дисахаридаз тонкої кишки (лактази, мальтази), здійснює трофічний вплив на слизову оболонку кишечника за рахунок поліамінів сперміну та спермідину [42, 43].

В Україні *Saccharomyces boulardii* зареєстровані під декількома торговельними назвами. З тих, які часто застосовуються є Нормагут, Міцерол-ратіофарм та Ентерол [36, 44, 45, 46].

З-поміж вищенаведених пробіотиків найбільшу увагу привертає Ентерол, оскільки його ефективність підтверджена ВООЗ, Європейським співтовариством педіатрів і гастроентерологів (ESPGHAN), незалежним центром національних керівництв охороною здоров'я (NICE), міжнародним об'єднанням кращих досягнень у медицині (MERC MANUAL). Проте найпопулярнішим у світі на сьогодні є саме *S. boulardii* від Biocodex (Ентерол 250). Це — єдиний пробіотик у світі з генетичною антибіотикорезистентністю, доведеною антидіарейною ефективністю, який протягом багатьох років з успіхом використовується у 102 країнах.

Ентерол використовують в комбінації з ентерофурилом і традиційними при ГКІ патогенетичними препаратами, що позитивно позначається на динаміці клінічних симптомів цих недуг і на нормалізації мікробіоценозу кишечника. Крім цього, в силу антагоністичної дії на патогенні та умовно-патогенні бактерії препарат забезпечує колонізаційну перевагу нормофлори в біоценозі кишок, а також посилює антибактерійний ефект етіотропного середника [35].

За 4 місяці 2020 року в Україні зареєстровано 16779 випадків захворювань на гостру кишкову інфекцію, що становить 40,3 випадки на 100 тис. населення [47]. У структурі ГКІ в Україні переважають: ротавірусна інфекція, сальмонельоз, шигельоз [48].

Пробіотик «Ентерол» також застосовують для лікування та профілактики діареї мандрівника (початок застосування: за 5 днів до прибуття по 1 пакетик на день протягом усієї подорожі; закінчення застосування: у день прибуття з країни здійснення подорожі. Препарат слід застосовувати кожен ранок натще) та діареї, пов'язана з довгостроковим ентеральним харчуванням, для загальних проблем травлення, синдрому подразненого кишечника (IBS), запального синдрому кишечника (IBD, хвороба Крона, виразковий коліт), при дисбіозі, гострій і хронічній бактеріальній діареї, при псевдомембранозному коліті та захворюваннях, зумовлених *Clostridium difficile* (застосовувати у схемах з антибіотиками у дозі 2 пакетики 2 рази на добу з першого дня застосування антибіотиків, протягом 4 тижнів) [49, 50].

Псевдомембранозний коліт - це захворювання, що характеризується пошкодженням слизової оболонки товстої кишки з вогнищевими або дифузними фібринозними накладеннями, що виникають в результаті впливу факторів патогенності *Clostridium difficile*. Це захворювання стало досить поширеним в останні роки. Причина - широке застосування антибіотиків, що спричиняє антибіотикоасоційовану діарею [51]. Це діарея, що виникла на тлі застосування антибіотиків через кілька днів після початку їх вживання і не пізніше ніж через 4 тижні після його припинення. Частота ААД повсюдно зростає. Клінічні її прояви стають тяжчими, і з цим пов'язане відчутне зростання частоти летальних випадків при даному захворюванні [52].

Крім цього дріжджі *Saccharomyces boulardii* використовують у вигляді дієтичної добавки «Опєфера», яка оптимізує функції організму, регулює рівновагу та нормалізує склад кишкової мікрофлори, підтримує нормальний баланс вагінальної мікрофлори [53].

Saccharomyces boulardii мають також широке використання у тваринництві. Дріжджі не належать до нормальної мікрофлори тварин, вони зустрічаються в різних природних середовищах існування, однак володіють вираженою антагоністичною активністю щодо широкого спектра умовно патогенних і патогенних мікроорганізмів, здатні забезпечувати оптимальні умови для підвищення продуктивності і зміцнення здоров'я тварин.

Так, використання *S. boulardii* в птахівництві мінімізує ризик зараження і захворювання птахів, а також знижує ризик зараження м'яса птиці такими патогенами, як *Staphylococcus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Candida* і т.д. [54].

Візьмемо до уваги, що *Saccharomyces* впливають на ефективність вакцинації тварин. Герпесвірус великої рогатої худоби (BoHV-5) є прикладом економічно важливого патогена тварин, для якого вакцини забезпечують лише обмежений захист. Для тварин, які отримували добавку з пробіотиками (*Bacillus toyonensis* і *Saccharomyces boulardii*), показано значне збільшення сероконверсії проти BoHV-5, ніж для тварин без добавки [55].

Великий інтерес має *Saccharomyces boulardii*, як кормова добавка для тварин, що стимулюють зростання для збільшення продуктивності тварин, з огляду на той факт, що з 2006 року Європейським союзом заборонено використовувати антибіотики в раціоні тварин.

Відомо, що дріжджі *S. boulardii* здатні синтезувати ферменти, які нейтралізують бактеріальні токсини. При попаданні в ШКТ - здатні пригнічувати ріст патогенних бактерій і сприяють виробництву м'яса і молока у великої рогатої худоби. Тому в сільському господарстві дріжджові пробіотики використовують не тільки для лікування і профілактики хвороб бактеріальної етіології, а й як біологічно активні добавки, які будуть стимулювати ріст і розвиток тварин [56].

Дріжджі ще використовується для переробки рослинної сировини, що дозволяє збагатити продукти харчування важливими мікронутрієнтами,

включаючи флавоноїди, феноли, вітаміни групи В, підвищити біодоступність антоціанів і мікроелементів.

Особливий інтерес представляє використання *S. boulardii* в виробництві ферментованих молочних продуктів. Це пов'язано зі здатністю *S. boulardii* стабілізувати рН і кислотність молочної сировини протягом тривалого періоду часу, забезпечуючи тим самим ідеальне середовище для росту і збереження життєздатності бактерій стартерних культур. Крім того, *S. boulardii* продукують цілий ряд вторинних метаболітів-нутрицевтиків, в тому числі антиоксидантів, які надають позитивний вплив на здоров'я [57].

Оскільки найбільшу увагу *Saccharomyces boulardii* привертає як пробіотик, тому для розрахунку орієнтовної річної потреби за основу беремо виробництво одержання біомаси для пробіотичного препарату «Ентерол», який використовують у лікуванні ШКТ.

Вихідні дані для розрахунку потреби наведено в табл 3.1

Таблиця 3.1.

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в біомасі *Saccharomyces boulardii* для одержання пробіотику «Ентерол»

Захворюван ня (профілакти ка) [57]	Доза преп арату на добу, мг [57]	Кіль кість біома си на добу, мг [59]	Кіль кість прийо му пакети ків на добу [57]	Трива лість прийо му, днів [57]	Кіль кість препар ату на одну людин у, мг	Кіль кість хвор их в Украї ні стано м на 2017 р [58]	Загаль на кіль кість пакети ків на всіх хвори х, шт	Загаль на кількст ь препар ату на всіх хворих , кг
Лікування шлунково- кишкового тракту	500	310	2	10	3 100	1086 968	21 739 360	3 369,6

Так станом на 2017 рік на хвороби органів травлення хворіло 2 563 випадків на 100 тис. населення [58]. Враховуючи, що кількість населення України на той час становило 42,41 млн. людей, то загальна кількість хворих буде:

$$N_{\text{хв}} = 42\,410\,000 \times 2563 / 100\,000 = 1\,086\,968 \text{ хворих}$$

Основна діюча речовина препарату - сухі дріжджі *Saccharomyces boulardii* (155 мг), ліофілізовані (захисне середовище (66,25 мг)). Допоміжними речовинами виступають (28,75 мг): лактози моногідрат, лактоза безводна, фруктоза, кремнію діоксид колоїдний безводний, смакова добавка «тутті фрукті». Міститься в пакетиках (250 мг) [30, 50 ,59].

Згідно інструкції щодо застосування даного препарату, до складу 1 пакетика входить 155 мг дріжджів, а термін вживання для лікування хвороб шлунково-кишкового тракту становить в середньому по одному пакетика порошка 1-2 рази в день протягом одного тижня або максимум 10 днів [57].

Тому, для розрахунку річної потреби Ентеролу (*Saccharomyces boulardii*):

$155 \text{ мг} \times 2 \text{ пакетика} \times 10 \text{ діб} = 3\,100 \text{ мг Ентеролу (Saccharomyces boulardii)}$
на курс лікування.

Згідно оброблених літературних джерел в Україні в рік хворобами шлунково-кишкового тракту хворіє 1 086 968 людей [58].

$1\,086\,968 \text{ людей} \times 3\,100 \text{ мг/людину} = 3\,369\,600\,800 \text{ мг/рік} = 3\,369,6 \text{ кг/ рік}$
Ентеролу

Отже, річна потреба Ентеролу (*Saccharomyces boulardii*) для лікування хвороб шлунково-кишкового тракту становить 3 369,6 кг.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

На українському ринку лікарських препаратів переважають імпортовані пробіотики (рис. 3.2).

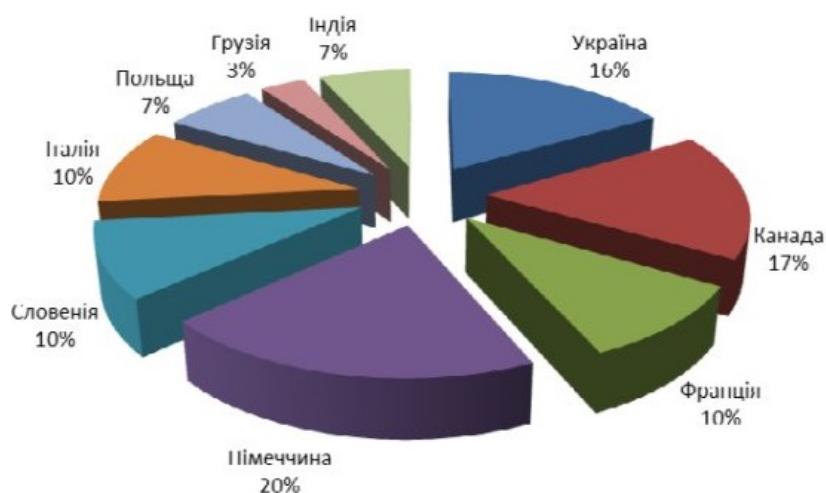


Рис. 3.2 Виробники пробіотичних лікарських препаратів, представлених на фармацевтичному ринку України [37]

Як видно з рис. 3.2, закордонні фірми займають біля 80 % українського фармацевтичного ринку в цій області [37].

Країною створення Ентеролу вважається Франція. Препарат випускається фармакологічним виробником Biocodex [57]. В Україні є підприємство ТОВ "Біокодекс Україна" (Київ) [60]. Оскільки препарат закордонного виробництва, то його активно імпортують з Франції.

З попередніх розрахунків був вибраний біологічний агент *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796, продуктивність якого становить $X_{кр} = 8,2 \text{ г/л} = 8,2 \text{ кг/м}^3$ культуральної рідини [26].

Плануємо, що вибрану кількість субстанції будемо виробляти $T_{рд} = 280$ робочих трудоднів. Для подальших розрахунків необхідно знати тривалість виробничого циклу. $T_{ф} = 16$ год. Субстанцію пробіотику отримують з сухою залишковою вологою $W = 3 - 5 \%$, отже сухої речовини в продукті буде $CP = 0,96$

Проаналізувавши діаграму (рис. 1.2) [37], можна зробити висновок, що вітчизняні виробники забезпечують тільки 16% фармацевтичного ринку України пробіотиками. Потрібно також врахувати, що хвороби ШКТ лікують не тільки Ентеролом, а й іншими лікарськими засобами. Розрахуємо потребу у біомасі *S. boulardii* з врахуванням реалізації даного проекту в Україні на рівні 6%, що дозволить забезпечити потреби в біомасі не тільки для лікарського засобу, а і для ветеринарії.

Отже, потужність виробництва складе:

$$G_{нп} = 3\,369,6 \times 0,06 = 202,18 \text{ кг}$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Потреба ринку України у біомасі *S. boulardii* для одержання пробіотику «Ентерол» складає $G_{нп} = 202,18 \text{ кг}$. Таку кількість біомаси необхідно одержати за $T_{рд} = 280$ днів. За літературними даними найвищий рівень синтезу біомаси ($X_{кр} = 8,2 \text{ г/л}$ за 16 год культивування) досягається за умов росту штаму *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796. Відповідно до ТУ вміст сухих речовин в готовому продукті $CP_{гп}$ складає 0,96 (частка). Для проведення подальших розрахунків приймемо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера $T_{цф}$

$= T_{\phi} + T_{\text{по}} = 16 + 10,5 = 26,5$ год, де T_{ϕ} – час культивування; $T_{\text{по}}$ – час проведення підготовчих операцій; коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1-1,5) $K_1 = 1,1$. Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту (центрифугування – 5%, ліофілізація - 4%, подрібнення - 3%, просіювання 4%, ПМВ – 4%)) частка $E_{\text{св}} = 0,2$.

1. Кількість продукту на добу:

$$G_{\text{нтд}} = G_{\text{нт}} / T_{\text{рд}} = 202,18 / 280 = 0,722 \text{ кг/добу}$$

2. Кількість біомаси за цикл:

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{нтв}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 0,722 \cdot 26,5 / 24 = 0,797 \text{ кг/цикл.}$$

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

$$V_{\text{кр}} = K_1 \cdot G_{\text{цк}} \cdot \text{CP}_{\text{гп}} / X_{\text{кр}} (1 - E_{\text{св}}) = 1,1 \cdot 0,797 \cdot 0,96 / 8,2 (1 - 0,2) = 0,128 \text{ м}^3$$

4. Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{\text{цк}} = G_{\text{нт}} / G_{\text{цк}} = 202,18 / 0,8 = 253 \text{ цикли.}$$

Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

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

$$V_{\phi} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\phi}) = 0,128 / (1 - 0,1) = 0,142 \text{ м}^3$$

Кількість поживного середовища в ферментері складе:

$$V_{\text{пс}} = V_{\phi} / (1 + X_{\phi}) = 0,142 / (1 + 0,1) = 0,129 \text{ м}^3$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву ферментера:

$$V_{\text{пмф}} = V_{\phi} - V_{\text{пс}} = 0,142 - 0,129 = 0,013 \text{ м}^3$$

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

$$V_{\text{гф}} = V_{\phi} / K_3 = 0,142 / 0,6 = 0,237 \text{ л}$$

За таблицею [61] обираємо ферментер геометричним об'ємом $0,25 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

$$K_3 = V_{\text{цк}} / V_{\text{ф}} = 0,142 / 0,25 = 0,57$$

– так як, даний коефіцієнт заповнення не перевищує допустимі межі, оптимальним рішенням є застосування ферментера об'ємом 250 л з коефіцієнтом заповнення 0,6.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 0,128 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15 %.

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

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 0,128 / (1 - 0,1) = 0,142 \text{ м}^3$$

$E_{\text{ф}}$ – витрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюється в ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 0,142 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_3 = 0,6$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера, що становить:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}} / K_{\text{зап}} = 0,142 / 0,6 = 0,237 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 0,250 \text{ м}^3$ [61], та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 0,142 / 0,250 = 0,57$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує допустимі межі, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментеру становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 0,142 / (1 + 0,1) = 0,129 \text{ м}^3$$

де $X_{\text{ф}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментеру.

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 0,142 - 0,129 = 0,013 \text{ м}^3$$

Для одержання $0,013 \text{ м}^3 = 13,0 \text{ л}$ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря які становлять 10 – 15 %.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 13,0 / (1 - 0,1) = 14,44 \text{ л}$$

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

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 14,44 / (1 + 0,1) = 13,13 \text{ л}$$

де $X_{\text{па}} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного матеріалу.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 14,44 - 13,13 = 1,31 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.2}} = 14,44 \text{ л}$ можна одержати під час культивування дріжджів у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{\text{па2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап}} = 14,44 / 0,6 = 24,07.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 0,03 \text{ м}^3$ (30 л) [61], уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{з1}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сф}} = 14,44 / 30 = 0,48.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не лежить в заданих межах (0,5 – 0,65), замовляємо у виробника інший геометричний об'єм ферментеру – $V_{\text{сф}} = 0,025 \text{ м}^3 = 25 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{з1}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сф}} = 14,44 / 25 = 0,58.$$

Кількість інокуляту для засіву посівного апарату $V_{\text{пм2}} = 1,31 \text{ л}$ можна одержати культивуванням дріжджів у колбах на качалці. Для цього використовують колби $V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм2}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}) = 1,31 / (0,75 \times 0,2) = 8,73$$

Таким чином для одержання посівного матеріалу необхідно 9 качалочних колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу біомаси у ферментері об'ємом 0,25 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 2 етапи.

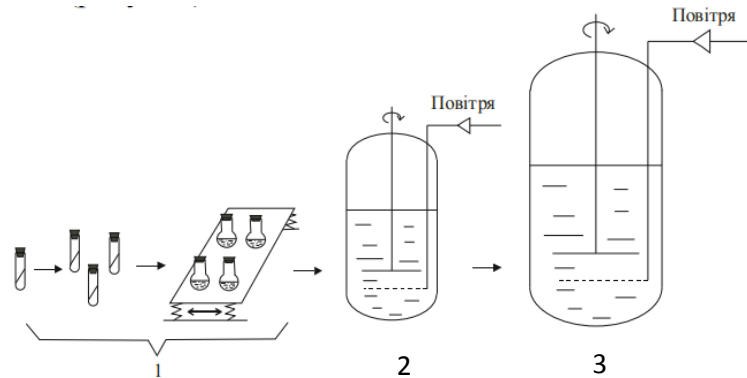


Рис. 3.3 Схема приготування посівного матеріалу *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796

- 1 – вирощування в лабораторії (у пробірках та колбах на качалці) 0,75 л = 750 мл (робочий об'єм однієї колби 150 мл = 1,31 л інокуляту);
- 2 – вирощування в посівному апараті об'ємом 25 л (робочий об'єм 14,44 л);
- 3 – вирощування у ферментері об'ємом 250 л (робочий об'єм 142 л).

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Оскільки обраного біологічного агента (*Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796) немає в системі пошуку KEGG, тому замінюємо його спорідненим мікроорганізмом – *Saccharomyces cerevisiae*. Як субстрат для катаболізму використовується глюкоза.

Базуючись на таких припущення та використовуючи як основу для створення катаболічного шляху глюкози катаболізм цукрів – гліколіз (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса), що представлений у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes для *Saccharomyces cerevisiae*, наводимо схему перетворення глюкози (рис.4.1, додаток 4) [62].

Глюкоза за участю глюкокінази (КФ 2.7.1.1) перетворюється на глюкозо-6-фосфат, де остання за дії глюкозо-6-фосфат ізомераз (КФ 5.3.1.9) перетворюється на фруктозо-6-фосфат. 6-фосфоглюкокіназа (КФ 2.7.1.11) активує перетворення фруктозо-6-фосфат у фруктозо-1,6-дифосфат. Ферментативна дія фруктозодифосф атаклази (КФ 4.1.2.13) на фруктозо -1,6-дифосфат зумовлює перетворення її на гліцеральдегід-3-фосфат та діоксiacетонфосфат, який під дією тріозофосфатізомераз (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат. До подальшого катаболізму глюкози залучається гліцеральдегід-3-фосфат, під дією гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) він перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у 3-фосфогліцерат. Дія 2,3-дифосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.11) на 3-фосфогліцерат індукує його перетворення на 2-фосфогліцерат. Під дією фосфогліцерат гідратази (КФ 4.2.1.11) 2-фосфогліцерат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40) [62].

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.	Зомчак В.В.				РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	Літ.	Арк.	Аркушів	
Перевір.	Грегірчак Н.М.						33	142	
Консультант						Кафедра БТМ 35			
Н.Контр.									
Затверд.	Пирог Т.П.								

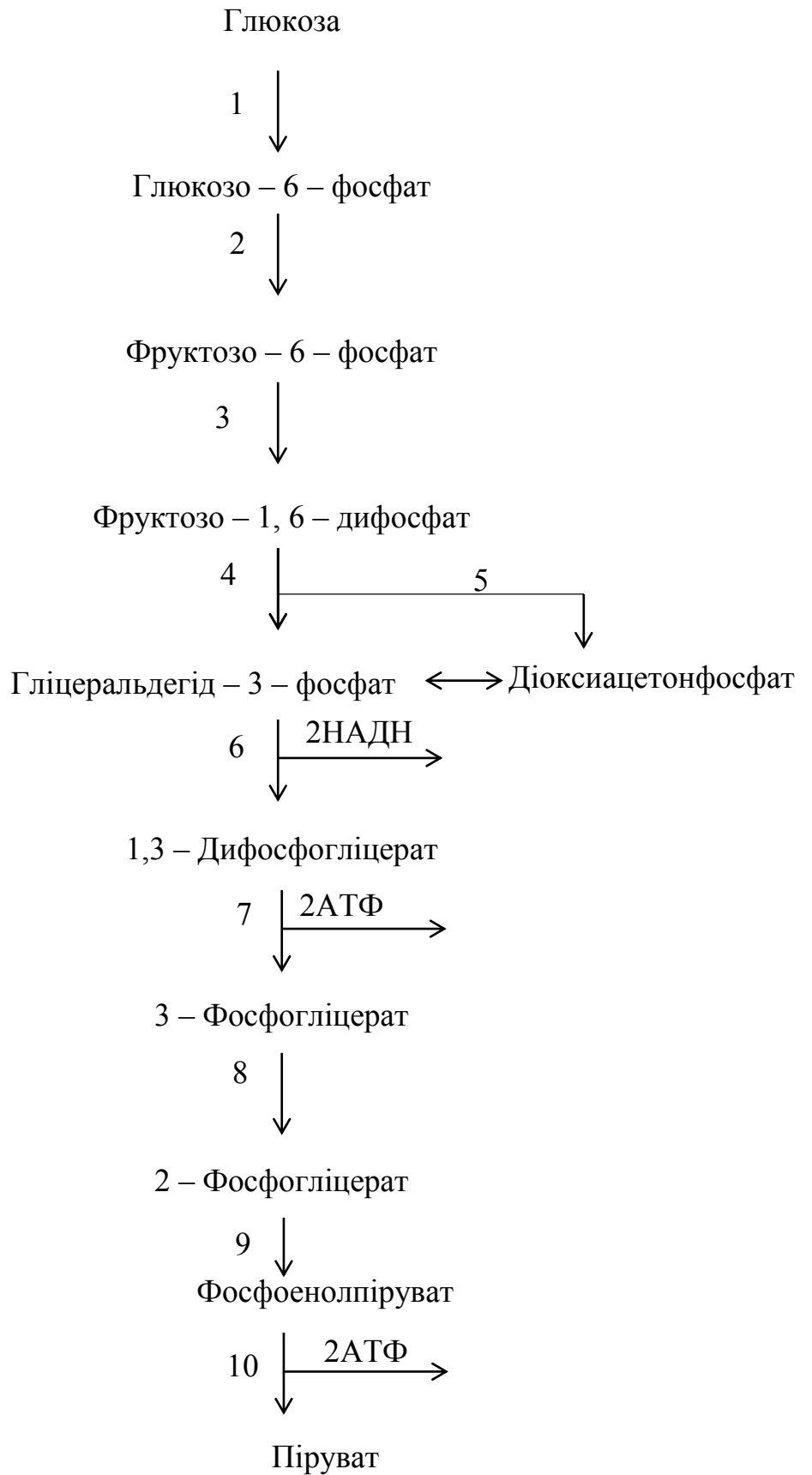


Рис. 4.1. Шлях катаболізму глюкози у *Saccharomyces cerevisiae*

Ферменти: 1-глюкокіназа (КФ 2.7.1.1), 2- глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9), 3- 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11), 4- фруктозодифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13), 5- тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) , 6-гліцеральдегід-3-фосфат дегдрогеназа (КФ 1.2.1.12), 7-фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3), 8 - 2,3-дифосфогліцератмутаза(КФ 5.4.2.11), 9-фосфогліцерат гідратаза (КФ 4.2.1.11), 10-піруваткіназа (КФ 4.7.1.40) [62].

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *Saccharomyces cerevisiae* з використанням глюкози як джерела вуглецю, внаслідок катаболізму вуглеводів, утворюється ацетил-КоА. Далі ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК).

Біогенез препарату на основі біомаси дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* включає синтез основних органічних сполук, що входять до складу мікробної клітини (нуклеїнових кислот, білків, полісахаридів і ліпідів).

Для біосинтезу **нуклеїнові кислоти**, необхідно синтезувати нуклеозидтрифосфати.

Пуринові нуклеотиди **АТФ** та **ГТФ** синтезуються з рибозо – 5- фосфату, продукту пентозофосфатного циклу. Піримідинові нуклеотиди **УТФ** та **ЦТФ** утворюються з карамбоїлфосфату (з глутаміну та CO₂) та аспартату.

Для біосинтезу **білків** необхідно синтезувати всі 20 амінокислот.

Амінокислоти аспартатної родини (**аспартат, аспарагін, метіонін**) утворюються з оксалоацетату, який є інтермедіатом ЦТК.

Амінокислоти глутаматної родини (**глутамат, глутамін, пролін, аргінін та лізин**) утворюються з 2-оксоглутарату (інтермедіату ЦТК).

Анаплеротичними реакціями, які забезпечують поповнення втрат інтермедіатів ЦТК – попередників біосинтезу амінокислот, при рості на глюкозі є реакції карбоксилування пірувату і фосфоенолпірувату.

Фруктозо-6-фосфат залучається до пентозофосфатного циклу, в якому утворюються попередники ароматичних амінокислот – фосфорибозилпірофосфат (попередник **гістидину**) і еритрозо-4-фосфат.

Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват – попередники *фенілаланіну, тирозину і триптофану*.

3-Фосфогліцерат є попередником *серину, гліцину, цистеїну і треоніну*. Піруват – попередник *аланіну, валіну, лейцину і ізолейцину*. Піруват утворюється з фосфоенолпірувату за допомогою піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

Лізин утворюється з 2-оксоглутарату і ацетил-КоА.

До клітинної стіки дріжджів входять такі **полісахариди**, як *глюкан та манан*, які синтезуються за допомогою глюкозо-6-фосфату та фруктозо-6-фосфату відповідно.

Біосинтез ліпідів здійснюється з діоксиацетонфосфату, який перетворюється на 3-фосфогліцерин, і разом з жирними кислотами, які утворюються від ацетил-КоА, синтезують **ліпіди**.

Анаплеротичними реакціями, які забезпечують поповнення втрат інтермедіатів ЦТК – попередників біосинтезу амінокислот, при рості на глюкозі є реакції карбоксилювання пірувату і фосфоенолпірувату, які каналізують ферменти піруваткарбоксилаза та фосфоенолпіруваткарбоксилаза.

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Культивування *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 передбачається здійснювати глибинним способом. Цей спосіб має ряд очевидних переваг перед поверхневим, оскільки дозволяє значно скоротити виробничі площі, виключити важку непродуктивну ручну працю, забезпечити асептичні умови (що є досить важливим, враховуючи фізико-хімічні показники продуцента), спрощує механізацію та автоматизацію виробництва, робить можливим перехід на безперервний спосіб культивування [63,64].

Оскільки основним завданням при вирощуванні даного штаму дріжджів є накопичення біомаси, найбільший рівень якої спостерігається у стаціонарній фазі росту, то доцільно використовувати періодичний спосіб культивування, адже за безперервного способу культура буде знаходитись в експоненціальній фазі, що є не вигідним в цьому випадку.

Для *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 найвищий рівень біомаси спостерігається при тривалості культивування 16 год [26, 64].

Зважаючи на оптимальну температуру росту для культивування (37°C), і значення рН (5,5), можна сказати що ризик контамінації є високим, тому культивування проводять в асептичних умовах, тобто необхідна стерилізація обладнання, комунікації і поживного середовища [26].

Враховуючи, що дріжджі є факультативними анаеробами, тому для максимального накопичення біомаси необхідний кисень, тобто процес культивування проводиться при подачі кисню. Аерація культуральної рідини проводиться вмонтованим барботером всередині ферментера, та додатковим перемішуванням для збільшення контакту фаз [63].

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.	Зомчак В.В.				РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.	Грегірчак Н.М.						37	142	
Консультант						Кафедра БТМ 39			
Н.Контр.									
Затверд.	Пирог Т.П.								

Отже, культивування *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 проводять глибинним та періодичним способом, в асептичних умовах з постійною аерацією.

Глибинне культивування проводять у вертикальних герметичних ємностях різного розміру, що називаються ферментаторами. Основна вимога до ферментатора – можливість проведення процесу культивування продуцента в асептичних умовах при інтенсивній аерації середовища. Для підтримання стерильних умов ферментатори мають бути абсолютно герметичними, а всі лінії трубопроводів повинні витримувати жорстку стерилізацію паром і працювати протягом всього культивування під невеликим надмірним тиском.

Всередині ферментера необхідно встановити 2 турбінні мішалки Раштона з відкритими лопатями, яка обертатиметься зі швидкістю 400 об / хв. [26].

Відкриті турбінні мішалки (рис. 5.1) являють собою, по суті, вдосконалену конструкцію простих лопатевих мішалок. Обертання декількох лопатей, розташованих під кутом до вертикальної площини, створює поряд з радіальними потоками осьові потоки рідини, що сприяє інтенсивному перемішуванню її в більших обсягах. Інтенсивність перемішування зростає при установці в посудині відбивних перегородок.

Переваги турбінних мішалок:

- 1) швидкість перемішування і розчинення,
- 2) ефективне перемішування в'язких рідин,
- 3) придатність для безперервних процесів.

Недоліком турбінних мішалок є порівняльна складність і висока вартість виготовлення [65].

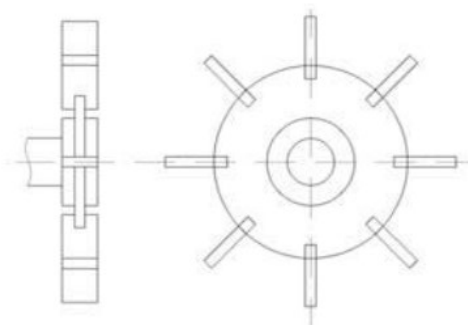


Рис. 5.1. Відкрита турбінна мішалка

Для підтримання постійної аерації необхідна наявність барботера, крім того такий спосіб підведення повітря є додатковим перемішуванням середовища культивування.

Збільшення кількості обертів мішалки призводить до утворення воронки, яка спричиняє низку незручностей при проведенні технологічних процесів: неоднакові рівні вільної поверхні у різних її точках, можливість оголення дна посудини і перепліскування рідини через її бокові стінки, зменшення інтенсивності перемішування і т.п. Тому при перемішуванні необхідно використовувати спеціальні пристрої, які запобігають утворенню воронки. Такими пристроями є вертикальні перегородки (які ще називаються відбивними перегородками) [66].

Під час культивування *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 в середовищі утворюється піна, тому є необхідність застосування стерильного піноутворювача, подача якого контролюватиметься насосом з низькою швидкістю подачі, каскадом із датчиком низької піни.

Оскільки оптимальна температура росту даного мікроорганізму є 37°C, а в аеробних процесах вирощування продуцента спостерігається значне тепловиділення, то для підтримання температури застосовують охолодження ферментера зворотною водою, яка подається в змійовики-теплообмінники або в секційну сорочку [67].

Ферментер обов'язково повинен бути обладнаний датчиками температури (підтримка 37°C), зондом рН (5,5), який контролюється шляхом додавання 6% NaOH та 6% HCl, ротаметром для концентрації розчиненого O₂ (для накопичення біомаси мікроорганізму потрібен кисень), датчиком для контролювання швидкості перемішування та датчиком піни, які забезпечать технологічний контроль за процесом біосинтезу [26].

Отже, для ферментації штаму *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 обираємо ферментер з турбінною мішалкою Раштона, обладнаний барботером, відбивними перегородками, піногасником, змійовиками-теплообмінниками та датчиками контролю.

Під час культивування у ферментаторі забезпечуються асептичний режим культивування, дотримання всіх параметрів зростання мікроорганізму і створюються сприятливі умови біосинтезу цільового продукту [63].

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Для проведення стерильного процесу ферментації велике значення має стерилізація повітря. Звичайно у повітрі міститься $0,8 \cdot 10^3 - 10^4$ на 1 м^3 різних мікроорганізмів. Повітря, що подається на вирощування промислових продуцентів необхідно стерилізувати [68].

Суттєвим елементом проектування системи підготовки повітря є вибір фільтрів. Фільтр – найважливіший компонент системи очистки повітря для чистих приміщень, оскільки з його допомогою остаточно встановлюється необхідний ступінь чистоти приміщення [69].

Враховуючи, що дріжджі *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 є факультативними анаеробами, тому під час виробництва, для максимального накопичення біомаси необхідним є використання кисню-повітря. Аерація культуральної рідини проводиться вмонтованим барботером всередині ферментера, та додатковим перемішуванням для збільшення контакту фаз [70] при культивуванні необхідно реалізувати стадію підготовки аераційного повітря.

Для знезараження повітря при вирощуванні посівного матеріалу та виробничому біосинтезі використовуємо очищене повітря на фільтрах.

Найпростіший спосіб стерилізації повітря полягає у фізичному видаленні мікроорганізмів фільтрацією через волокнисті або мембранні фільтри. Процес підготовки очищеного аераційного повітря включає декілька стадій, а саме:

- ✓ забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрозабірником у найвищій точці ($H = 3 \text{ м}$) будівлі, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря;
- ✓ очищення повітря від пилу відбувається на плоских тканинних фільтрах грубого очищення ($\delta > 50 \text{ мкм}$);
- ✓ стиснення повітря в компресорі, при чому відбувається його нагрівання до температури $120 - 200 \text{ }^\circ\text{C}$ і збільшення вологовмісту;

✓ охолодження стисненого повітря до температури «точки роси», за якої волога повітря конденсується і відводиться, відбувається у теплообміннику-охолоджувачі;

✓ видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора здійснюється у ресивері, також тут відбувається зменшення пульсацій руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря;

✓ стабілізація показників (тиск, температура) відбувається підігріванням до температури 45-50°C паром у теплообміннику-нагрівачі;

✓ очищення у головних ємнісних набивних фільтрах до ступеня очищення $E = 95\%$; головні фільтр встановлюється поблизу ферментаційних відділень;

✓ очищення в індивідуальних фільтрах. Повітря від головних фільтрів через трубопроводи (колектори) подається безпосередньо до індивідуальних фільтрів, встановлених на ферментері. При цьому повітря очищають до ступеня очищення $E 99,995\%$ [67, 71, 72].

Згідно з стандартом фільтрувальні елементи підрозділяються на такі групи:

Група G - фільтри грубого очищення – фільтри попередньої очистки (course dust filters). Використовуються в приміщеннях і процесах з низькими вимогами до чистоти повітря. Попереднє очищення в системах вентиляції та центрального кондиціонування. Фільтри групи G підрозділяються на чотири класи: G 1; G 2; G 3; G 4 [72].

Група F - фільтри тонкої очистки (fine dust filters). Використовують в системах кондиціонування і вентиляції. Очищення повітря газотурбінних агрегатів. Застосовуються в якості фільтрів другого ступеня очищення (доочищення). Фільтри групи F підрозділяються на три класи: F 7; F 8; F 9 [72].

Група H – фільтри абсолютної очистки (High Efficiency Particular Airfilters) HEPA. Застосовуються для чистих зон, чистих приміщень. Фільтри групи H підрозділяються на п'ять класів: H 10; H 11; H 12; H 13; H 14 [72, 73].

Група U - фільтри остаточного очищення (Ultra Low Penetration Air) ULPA. Застосовуються в приміщеннях з найвищими вимогами до чистоти повітря [38]. Фільтри групи U підрозділяються на три класи: U 15; U 16; U 17 [72].

Для виробництва біомаси *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 використовують триступінчасте очищення повітря за допомогою фільтрів грубого, тонкого очищення на першому й другому ступені, відповідно, і мікрофільтрів або фільтрів абсолютно тонкого очищення - на третьому.

Отже, на першій і другій ступенях очищення доцільно використовувати фільтри панельного типу EU4, EU9, в якості фільтрів третього ступеню очищення використовують фільтри HEPA H14 [68, 74, 75].

Матеріал фільтрувальних елементів повинен бути вироблений з відповідних матеріалів, здатних витримати звичайне користування та вплив температури, вологості і корозії, які імовірно трапляються. Конструкція фільтрів повинна витримувати механічні навантаження, які можуть впливати на фільтр в процесі його експлуатації [72].

Фільтруючий матеріал для панельного повітряного фільтру грубого очищення з класом фільтрації G4 може бути виконаний з целюлози, голкопробивного нетканого волокна, скло- і мікроскловолокна [74].

Панельні фільтри тонкого очищення виготовляють з різних матеріалів: хімволокно, скловолокно, металева сітка, ретикульований пінополіуретан, целюлоза, голкопробивні неткані волокна [74].

HEPA фільтри складаються з мату хаотично розташованих волокон. Волокна, як правило, складаються з скловолокна і мають діаметр від 0,5 до 2,0 мікрометрів. Основні чинники, що впливають на функції - це діаметр волокна, товщина фільтра, а також обсяг робочого повітря. Повітряний простір між волокнами HEPA фільтр набагато більший, ніж показник в 0,3 мкм [76].

Після проведення процесу ферментації, очищене відпрацьоване повітря через колектори подається на аналогічні головні фільтри для очищення. Так як об'єми використовуваного повітря не великі, даний фільтр встановлений

безпосередньо на ферментері. Після очищення, його подаються на знешкодження до відповідного обладнання [67].

5.1.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Поживне середовище для вирощування *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 з метою одержання цільового продукту – біомаси пробіотичних дріжджів, має наступний склад, г/л [26]:

- глюкоза, 20,0;
- кукурудзяний екстракт, 15,0;
- NaNO_3 , 1,0;
- KH_2PO_4 , 6,0;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0;
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,002;
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001;
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01.

Таблиця 5.1

Результати розрахунку об'ємів ферментаційного обладнання для підготовки посівного матеріалу і виробничого біосинтезу

Об'єм ферментера, л	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера, л	Об'єм посівного матеріалу, л	Конденсат (10%), л	Об'єм поживного середовища, л
250	0,6	142	13,13	19,35	129
25	0,6	14,44	1,31	1,31	13,13
0,75	0,2	0,15	0,120	-	1,19

5.1.3.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *S. boulardii* ATCC-MYA-796, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: глюкоза, кукурудзяний екстракт. Наважку переносять у колбу, додають питну воду та перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою

пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, 0,05 МПа, протягом 30 хв.

Композиція Б: KH_2PO_4 . Наважку поміщають у колбу, додають дистильовану воду, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131°C, 0,15МПа, 50 хв.

Композиція В: $NaNO_3, MgSO_4 \cdot 7H_2O, CuSO_4 \cdot 5H_2O, FeSO_4 \cdot 7H_2O, ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Наважку поміщають у колбу, додають питну воду. Отриманий розчин доводять до рН 5.5, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131°C, 0,15МПа, 50 хв.

Глюкоза та кукурудзяний екстракт (композиція А) є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації. Фосфати (композиція Б) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію. Солі композиції В стерилізують при стандартній для солей температурі. Стерилізацію композицій А Б і В здійснюють в автоклаві.

Враховуючи, що для засіву використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 120 мл, то необхідно приготувати 1 190 л поживного середовища. Джерелом вуглецю виступає глюкоза, джерелом азоту – кукурудзяний екстракт та нітрат натрію.

5.1.3.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті

На даному етапі використовуємо стаціонарно-стерилізаційний посівний апарат об'ємом 25 л з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Для культивування дріжджів в посівному апараті необхідно приготувати 13,13 л поживного середовища, для засіву посівного апарату використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 1,31 л.

Для приготування поживного середовища використовуємо питну воду, так як у середовищі немає кальцію, джерелом якого є саме така вода.

Композиція А: глюкоза, кукурудзяний екстракт. Наважку переносять у реактор-змішувач об'ємом 20 л, додають питну воду, перемішують, закривають

і стерилізують при температурі 112 °С, 0,05 МПА, протягом 30 хв. Після стерилізації композицію А вносять до посівного апарату.

Композиція Б: KH_2PO_4 , $NaNO_3$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Наважку поміщають у колбу об'ємом 5 л, додають питну воду, перемішують. Отриманий розчин підкислюють до рН 4 - 4.5 розчином соляної кислоти (для унеможливлення утворення осадів). Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 131°C, 0,15 МПа, 50 хв. Після цього композицію вносять до посівного апарату.

Для стабілізації рН, яке повинно дорівнювати 5.5, у середовище вносять стерильного 6% NaOH.

5.1.3.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Для культивування дріжджів у ферментері необхідно приготувати 129 л поживного середовища.

Для засіву ферментера використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 13,13 л.

Для приготування поживного середовища використовуємо питну воду, так як у середовищі немає кальцію, джерелом якого є саме така вода.

Середовище ділять на такі композиції:

Композиція А: глюкоза, кукурудзяний екстракт. Наважку переносять у реактор-змішувач об'ємом 100 л, додають питну воду, перемішують, закривають і стерилізують при температурі 112 °С, 0,05 МПА, протягом 30 хв. Після стерилізації композицію за допомогою перистальтичного насоса перекачують у ферментер.

Композиція Б: KH_2PO_4 , $NaNO_3$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Наважку поміщають у збірник об'ємом 40 л, додають питну воду.

Солі композиції Б змішуються у збірнику на 40 л, після чого вони поступають в ферментер об'ємом 250 л і стерилізуються при 131°C впродовж 50

хв, рН 4-4.5 підтримується за рахунок додавання 6% HCl, Після стерилізації в середовище вносять композицію А.

Перед внесенням посівного матеріалу рН середовища повинно дорівнювати 5.5, додаючи стерильного NaOH.

5.1.4. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Для створення рН розчину солей в межах 4,0-4,5 перед стерилізацією (для унеможливлення утворення осаду), у поживне середовище додають 6% HCl з розрахунком в кількості 0,2 % від об'єму культуральної рідини. Розчин соляної кислоти додають при приготуванні поживного середовища.

Для доведення рН середовища до оптимального, після стерилізації при рН 4,0-4,5, додають 6% NaOH (контроль рН) з розрахунком в кількості 0,2 % від об'єму культуральної рідини. Розчин лугу додають в охолоджене поживне середовище.

Процеси піноутворення і піногасіння відіграють важливу роль під час даного виробництва, оскільки культивування *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 здійснюється глибинним способом при постійній аерації.

Також до складу поживного середовища входить кукурудзяний екстракт, який при інтенсивному перемішуванні збільшує кількість утворення піни.

Важливо дотримуватись збалансованих пінних режимів, тому що при цьому збільшується міжфазна контактна поверхня і досягається інтенсивний масообмін між середовищем і аеруючим повітрям. Перекидання піни вкрай небажаний, тому що при цьому може відбутися намокання повітроочисних фільтрів і порушення умов герметизації й стерильності процесу.

Для забезпечення ефективного процесу піногасіння використовують механічні та хімічні піногасники. В якості механічного піногасника виступає мішалка, однак цей спосіб знищення піни є малоефективним, тому для підвищення ефекту варто застосовувати також хімічні піногасники [77].

За здатністю до запобігання утворенню піни піногасники групуються за їх хімічною природою на синтетичні (силікони, пропіноли, контрамін,

поліформаль), які мають велику ефективність, та дещо меншу ефективність мають спиртові піногасники (пропінол та октанол) [77, 78].

Силіконові піногасники перевершують органічні аналоги по піногасним властивостям, працюють швидше, діють довше. Відрізняються економічністю (витрата від 0,0001 до 1% вологи) – їх поверхневий натяг дуже малий і вони швидко розтікаються по середовищі. Вони хімічно інертні до більшості речовин – діють незалежно від компонентів, що викликають спінювання [79].

Силіконовий піногасник виготовляють методом механічного емульгування води, емульгатора, силіконового мастила та водовідштовхувальних засобів. Характерним для нього є надзвичайно висока поверхнева активність та потужність, також можна зауважити низький рівень дозування.

Він не змішується з органічними речовинами та водою, йому властива відмінна термостійкість, тож може використовуватися у надзвичайно широкому діапазоні температур. Через надвисокий вміст емульгатора його набагато легше дозувати завдяки низькій в'язкості. Силіконовий піногасник характеризується відмінною стійкістю до кислот та лугів, демонструє високу ефективність у системах з надзвичайно високими показниками ПАР. Його можна використовувати у різних сферах, адже визначальне значення має рН.

Основними перевагами силіконових піногасників є:

- відмінна потужність, тому потрібне невелике дозування;
- невисокий поверхневий натяг;
- відмінний баланс з поверхнею;
- не впливає на основну природу системи;
- хороша дифузія;
- високі показники безпеки [80].

Завдяки відносно невеликій в'язкості піногасника, він легко перекачуються насосом. Окрім того компоненти піногасника не вступають в будь-які реакції в процесі обробки, тому що взаємодіють з середовищем типу «олія-вода» [79].

Отже, як піногасник використовуємо 30% силіконово-водну емульсію, силіконову рідину готують в кількості 0,2 % від об'єму культуральної рідини [81].

5.2. Обґрунтування стадій виділення цільового продукту

«Ентерол» - це препарат біологічного виробництва, до складу якого входить ліофільно висушена біомаса дріжджів *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 з залишковою вологістю 5% [8]. Він є антидіарейним і протимікробним препаратом з групи пробіотиків, який направлений на регуляцію чисельності мікрофлори кишечника [9].

«Ентерол» є готовим лікарським засобом. Форма випуску препарату - порошок для орального застосування [12].

Технологічна схема виділення пробіотичного препарату включає: відокремлення біомаси від культуральної рідини, стадію додавання захисного середовища до отриманої біомаси, стадію сушіння, подрібнення та просіювання висушеної біомаси, стадію фасування, пакування, маркування та відвантаження готового продукту [82].

5.2.1 Вибір способу відділення біомаси та відповідного обладнання

Для багатьох біотехнологічних виробництв заключний етап виділення починається розподіленням двох фаз. Кінцевим продуктом мікробного синтезу може бути культуральна рідина, біомаса клітин або певний метаболіт [83].

Цільовим продуктом є висушена біомаса дріжджів. Для відділення біомаси найчастіше застосовуються такі методи:

- сепарування;
- фільтрування;
- флотація;
- центрифугування [84, 85].

Сепарація – процес відділення твердої фази від рідкої, оснований на відділенні часточок з різними характеристиками. Рушійною силою процесу являється відцентрова сила. Ефективність сепарування пропорційна частоті

обертів барабану, діаметру барабану, розміру часток, різниці густин твердої та рідкої фаз [86, 87].

Сепаратори поділяються на 4 групи:

1. *Сепаратори-роздільники* – для розділення суміші взаємно нерозчинних рідин;
2. *Сепаратори-згущувачі* – для концентрування або згущення суспензій і емульсій (наприклад, відділення кашалотовою жиру, застосовуваного для піногасіння, від культуральної рідини);
3. *Сепаратори-прояснювачі* – для виділення твердих суспензій з рідини (наприклад, відділення ферментів після висалювання, осадження розчинниками й т.д.); ці сепаратори, в залежності від типу барабана, поділяються на 2 типи: тарілчасті (для розділення суспензій з невеликою різницею у відносній густині поділених фаз) та багатокамерні (для розділення суспензій зі значною різницею у відносній густині фаз).
4. *Комбіновані сепаратори* - служать для виконання двох або більше операцій переробки рідкої суміші (сепаратори-екстрактори для проведення екстракції, сепаратори-реактори для проведення хімічних реакцій) [88].

Оскільки недоліком сепарування є підвищена енергоємність процесу та високий механічний вплив на клітини, що може негативно відзначитись на пробіотичні властивості дріжджів, то даний спосіб відділення не рекомендується використовувати.

Фільтрування – це процес відділення твердої фази від рідкої шляхом проходження через фільтруючий матеріал або через полімерну сітку з відповідним діаметром отворів [86, 64, 89].

Фільтри бувають періодичної дії (нутч-фільтри, листові фільтри, фільтрпреси і патронні згущувачі) та фільтри безперервної дії (барабанні, дискові, стрічкові) [90].

Стрічкові фільтри. Культуральна рідина фільтрується крізь пористу стрічку, на поверхні якої залишаються тверді частинки. Осад можна промивати водою. Потім осад просушують на стрічці та відділяють на тканині за допомогою

ножа. Регенерацію стрічки проводять водою в нижній її частині. Питома продуктивність 1000–1500 $\text{дм}^3/\text{м}^2 \cdot \text{год}$ при фільтрації дріжджових культур, та бактеріальних – в 4-6 разів менша. Перевагою є крихкість осаду на стрічці, зручність промивання осаду, а недоліком – значні габарити, одержання каламутного фільтрату [90].

Барабанні вакуум-фільтри. Барабанні вакуум-фільтри застосовують для відділення біомаси мікроорганізмів від культуральної рідини та фільтруванні суспензій, що містять тверді частинки кількістю 50–500 $\text{г}/\text{дм}^3$. Питима продуктивність для дріжджових культур – 1,0 $\text{м}^3/\text{м}^2 \cdot \text{год}$, а для бактеріальних – до 0,2 $\text{м}^3/\text{м}^2 \cdot \text{год}$. Перевагою є високий ступінь механізації, безперервність фільтрації різних суспензій при постійній швидкості барабана. Недоліками – громіздкість, низька питома поверхня фільтрування, неможливість забезпечити асептичні умови [90].

Тарілчастий фільтр (планфільтр). Для фільтрації суспензій з важкими і грубозернистими матеріалами і потребує ретельного промивання. Суспензія поступає на горизонтальний диск з низькими бортами, обтягнутий фільтруючою тканиною. Осад видаляється ножами після повного обороту диска, фільтрат проходить через тканину, потрапляє в осередки диска, а звідти видаляється через канали у вертикальному валу. Деякі планфільтри мають перекидні сектори, що дозволяє краще очищати тканину. Перевагами є швидкий процес фільтрації, зручність промивки, можливість фільтрації суспензії з неоднорідними за величиною частинками. Недоліки – громіздкість установки, мала фільтрувальна поверхня, ускладнення знімання осаду і регенерації тканини [90].

Отже, фільтрування є малоефективним та енергозатратним способом розділення біомаси і культуральної рідини. Головним недоліком фільтрування є великі втрати біомаси та уповільнювання процесу за рахунок налипання та засмічення пор фільтруючого матеріалу клітинами мікроорганізмів [86, 64, 89].

Флотація – це захоплення біомаси мікроорганізмів кульками піни і виділення їх із пінної фракції. Перевагою флотації є економічність, висока

продуктивність і можливість використання в безперервних процесах. Недоліком являються великі втрати біомаси (до 15%). [68, 91].

Центрифугування - процес зневоднення і розділення суспензій на рідку і тверду фази під дією відцентрових сил. Принцип дії центрифуг у загальному вигляді полягає в тому, що рідинна неоднорідна система подається в барабан (ротор), який обертається в горизонтальній чи вертикальній площині. У барабані рідина утворює кільце, в якому і відбувається розділення. У полі відцентрових сил дисперсна (внутрішня) фаза залежно від її густини або осідає на стінки барабана центрифуги, або переміщується до її центру [86].

Центрифугування дає змогу виділяти з культуральних рідин біомасу бактерій, дріжджів, міцеліальних грибів.

Класифікація промислових центрифуг:

- за принципом роботи — відстійні (осаджувальні) центрифуги, фільтруючі центрифуги, сепаратори;
- за характером роботи — центрифуги періодичної та безперервної дії;
- за розміщенням вала — горизонтальні, похилі та вертикальні;
- за вивантаженням осаду — з ручним і механізованим вивантаженням [86].

Осаджувальні центрифуги використовують для поділу емульсій і суспензій за допомогою осадження дисперсних частинок під впливом відцентрових сил.

Фільтруючі центрифуги широко застосовуються у хімічній галузі. Центрифуги також класифікують за типом організації процесу, за розміщенням вала та за способом вивантаження осаду [85].

Перевагами центрифугування є менші втрати біомаси порівняно з фільтруванням та флотацією, можливість автоматизувати процес та високій фактор розділення [86].

Час центрифугування і число обертів залежать від розмірів клітин. Чим вони менше, тим більше потрібно обертів і тим тривалішим має бути час центрифугування. Найчастіше центрифугують 15–20 хв з 5–10 тис. обертів за хв [92].

Отже, для відділення біомаси дріжджів *S. boulardii* ATCC-MYA-796 від культуральної рідини використовуємо центрифугування, оскільки цей метод ефективно застосовується на сучасних фармацевтичних підприємствах. Як апарат обираємо горизонтальну осаджувальну центрифугу з безперервним принципом дії.

Враховуючи, що розміри дріжджів, які піддаються центрифугуванню складають 5-10 x 5-13 мкм, то оптимальна кількість обертів та тривалість процесу для відділення біомаси, без негативного впливу на клітину, буде дорівнювати 5000 об/хв впродовж 15 хв [86, 93].

5.2.2. Вибір захисного середовища

Застосування стадії ліофільного висушування потребує змішування біомаси дріжджів з захисним середовищем з метою захисту клітин від значних змін в їхніх структурі на даному етапі.

Важливим етапом роботи є оптимальний підбір захисних середовищ для ліофільного висушування препарату, оскільки цей процес пов'язаний із переходом зв'язаної та вільної вологи речовини із кристалічної форми в газоподібну, минаючи рідку фазу, що можливо лише за певних умов (температура, вакуум), та напряду впливає на його імунологічну активність і можливість довготривалого зберігання [94].

Кількість життєздатних клітин після ліофілізації значною мірою залежить від складу захисних середовищ. Виживаність дріжджових клітин під час ліофілізації можна збільшити, підбираючи захисні середовища до оптимального їх складу і співвідношення компонентів у середовищі, що запобігають або зменшують інтенсивність деструктивних процесів.

Існують загальні вимоги до захисних середовищ. Вони мають бути гідрофільними (речовини, які не зв'язують воду, не є захисними для мікроорганізмів за їх ліофілізації) і не містити солей (для цього їх готують на дистильованій воді) [95].

Поживні середовища, до складу яких входять вуглеводи (глюкоза і сахароза як гідрофільні речовини), желатина й агар (як колоїди), максимально

захищають клітини мікроорганізму від шкідливого впливу ліофілізації і не мають антигенних властивостей. Ці середовища можна вважати гідрофільними, але вміст зазначених речовин не повинен бути надмірним. Занадто великий вміст гідрофільних речовин уповільнює процес висушування, створює підвищену залишкову вологість і зменшує розчинність сухого препарату [95].

Гідрофільність дріжджових суспензій змінюються в залежності від вмісту вуглеводів і їхньої концентрації за одних і тих самих умов ліофілізації. З використанням глюкози та сахарози в кількості 10% показники залишкової вологості складають 2,85 і 1,94%, відповідно.

Окрім наявності речовин, від яких залежить гідрофільність матеріалу, в середовищі мають бути ще й речовини, які максимально захищають клітини мікроорганізму від шкідливого впливу заморожування і висушування. У роботі [96] показано, що желатоза здатна захищати мікроорганізми від згубної дії процесів заморожування та ліофілізації. Найбільш цінними властивостями желатози в захисних середовищах було те, що вона забезпечувала ліофільну структуру сухого матеріалу і, на відміну від желатини, була не дуже в'язкою, не утворювала гелів навіть за високої концентрації і не мала антигенних властивостей.

Для досягнення максимальної фіксації клітин у сухому матеріалі і запобігання надмірного висушування клітини (залишкова волога — на рівні 1,9%), оптимальний вміст желатози – 10% [95].

Згідно Європейській Фармакопеї та Державній Фармакопеї України, для приготування захисного середовища використовуємо воду очищену.

Отже, склад захисного середовища для біомаси дріжджів *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 включатиме (%): сахарозу — 10,0; желатозу — 10,0; агар — 0,02. Вміст захисного середовища – близько 30% від дози препарату.

5.2.3. Вибір способу сушіння та сушарки

Наступним етапом є одержання сухого порошку *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 (залишкова вологість – 4%). Основним раціональним способом

досягнення даної мети є використання методу сушіння. Існує цілий ряд методів сушіння речовин [97]:

- ❖ Конвективне сушіння;
- ❖ Контактне сушіння;
- ❖ Терморадіаційне сушіння;
- ❖ Сушіння при нагріванні струмами високих частот;
- ❖ Сублімаційне сушіння (ліофілізація).

Метод конвективного сушіння є одним з найпоширеніших, основою якого є безпосередній контакт матеріалу з потоком нагрітого газу. В процесі волога випаровується за допомогою теплоти нагрітого газу, він одночасно поглинає і виносить із сушарки утворену водяну пару. До цієї групи сушарок належать камерні, тунельні, стрічкові, барабанні, розпилювальні (найбільш поширені), пневматичні, сушарки з псевдозрідженням і віброкиплячим шаром [98].

Контактний метод сушіння базується на передачі тепла від теплоносія через металеву стінку до матеріалу. Головним *недоліком* є те, що сушильні шафи відносяться до апаратури періодичної дії, в якій великий відсоток робочого часу витрачається непродуктивно (завантаження, вивантаження матеріалів).

Для сушіння різних харчових продуктів у тонкому шарі застосовують *терморадіаційний метод*, теплота при якому передається інфрачервоним промінням.

Ще одним методом, який застосовується в промисловості, є *акустична сушка* – процес видалення вологи з матеріалу під впливом акустичних коливань високої інтенсивності ультразвукового діапазону [98].

Сублімаційний метод (ліофілізація) — найбільш зручний і широко застосовуваний спосіб видалення води для підвищення стабільності при зберіганні пробіотиків. При використанні ліофільного висушування не порушується нативна структура білків. В процесі ліофілізації вода випаровується, міняючи рідкий стан. У речовинах припиняються всі біохімічні процеси, клітини входять в стан анабіозу. Таким чином, пробіотики довгий час

зберігають свої властивості, а початкові властивості препарату відновлюються при контакті з водою або фізіологічним розчином

Цей процес можна розділити на три етапи: заморожування, первинна сушка та вторинна сушка.

Недоліками ліофілізації є необхідність ретельної підготовки препарату до сушки (змішування з захисним середовищем), створення високого вакууму для повноти висихання, тривалість сушіння і досить високі енерговитрати [99].

Дані методи мають свої переваги та недоліки, орієнтовані на специфічні речовини та технологічні процеси, однак, при виборі способу сушіння слід керуватися, насамперед, властивостями цільового продукту та можливістю використання того чи іншого типу сушіння [97].

Отже, для висушування біомаси дріжджів *S. boulardii* ATCC-MYA-796 (залишкова вологість – 4%) використовуємо ліофільну сушарку, оскільки тільки даний метод може забезпечити не пошкодженою початкову структуру білків для збереження життєздатності та пробіотичних властивостей після висушування, що є найважливішою умовою при отриманні пробіотичного препарату.

Процес ліофільного висушування проходить у дві стадії. Перша стадія - вивільнення вільної води до 80—85 %, причому, швидкість сушіння постійна та займає 40—50 % загального часу; друга стадія - видалення до 96—99 % води, що знаходиться у зв'язаному стані, тобто та, що входить в структуру дріжджових клітин [100].

На швидкість та якість процесу сублімації впливає ряд факторів: концентрація клітин, обсяг препарату, що висушується та площа поверхні випаровування, наявність та властивості кріопротектора.

Режим заморожування визначає якість ліофілізованого продукту. Форма, розміри, однорідність пор пористої матриці висушеного шару, яка формується при сублімації льоду на першій стадії сушки, залежить від розмірів кристалів льоду, утворених під час заморожування. Ця залежність є надзвичайно важливою, оскільки пориста структура висушеного шару в значній мірі впливає на швидкість масопередачі. Якщо кристали дрібні і неоднорідні, швидкість

масопередачі у висушеному шарі сповільнена. І навпаки, коли формуються крупні кристали льоду, можливе утворення гомогенної дисперсії в замороженому матеріалі – швидкість масопереносу висока і матеріал швидко висихає. При виборі режиму заморожування необхідно враховувати, що швидке заморожування призводить до утворення численних кристалів льоду невеликого розміру; під час поступового заморожування утворюються кристали більшого розміру, але менш чисельні [37].

Ліофільне висушування дріжджів *S. boulardii* ATCC-MYA-796 буде проходити за таких параметрів: заморожування відбувається при температурі -60°C упродовж 24 год. Далше відбувається висушування: вмикається вакуумний насос та відкривається головна засувка установки $P = 26,6$ Па. В цій фазі сублімується 95% вологи матеріалу. Ця фаза є повільною. Тиск контролюється частковим вакуумуванням, оскільки це пришвидшує сублімацію, виступаючи в ролі провокативного процесу випаровування. Випаровування зв'язаної води відбувається за допомогою вакуумної сушки. Далше відбувається повторне осушення для видалення молекул незамерзлої води. Температуру навколишнього середовища підвищують, провокуючи швидке випаровування поверхневої вологи, можуть різко знижувати тиск, для пришвидшення процесу. Під кінець фази повторного осушення, залишкова волога становить 4%, а втрата маси при висушуванні до 3,5% [37].

5.2.4. Вибір способу подрібнення та подрібнювача

Біомасу дріжджів потрібно подрібнювати, оскільки після ліофільного висушування вона має вигляд суцільного твердого коржа [82].

Машини для подрібнення поділяються, залежно від конструктивних особливостей, поділяються на такі типи: дробарки щоківі, конусні, валкові, молоткові, барабанні; бігуни та кульові, стрижневі, вібраційні, колоїдні млини тощо [86].

Залежно від призначення і принципу дії в машинах для подрібнення можуть використовуватися різні види навантажень: розчавлювання (стискування

шматка), злам (вигин), розколювання (еквівалентно розтягуванню), стирання і удар.

Враховуючи, що після висушування біомаса дріжджі матиме вигляд коржа, то з вище наведених видів навантаження підходять стирання, удар або змішаний принцип дії. На змішаному принципі удару і стирання працюють барабанні або кульові млини, вібромлини [101].

Оскільки цільовий продукт – пробіотична біомаса, стирання не можна використовувати, тому що процес відбувається під дією тертя, тобто підвищення температури, що негативно впливає на життєздатність мікроорганізмів.

До дробарок ударної дії відносять молоткові дробарки, барабанні млини, дезінтегратори [101].

Дезінтегратори належать до дробарок, подрібнення в яких ґрунтується на принципі вільного удару. Дезінтегратор складається з двох барабанів, які входять один в один. Барабани обертаються в протилежні сторони від самостійних приводів. Матеріал, що подрібнюється, надходить через воронку в центральну частину одного з барабанів та потрапляє між пальцями, які рухаються назустріч один одному, та просувається до периферії за рахунок відцентрової сили. За рахунок зменшення відстані між пальцями та збільшення їх колової швидкості інтенсивність подрібнення збільшується. Подрібнений матеріал потрапляє в кожух дезінтегратора та направляється до вихідного патрубку.

Недоліком дезінтегратора є те, що у всіх рядах дисків, крім останнього, ударні елементи виконані у вигляді лопаток, довжина яких у кожному наступному ряді, рахуючи від центра, більша, ніж у попередньому. Це обмежує кількість ударних елементів на кожному диску, що не дозволяє одержати досить високий ступінь здрібнювання продукту, що утрудняє подачу його в розвантажувальний патрубок і знижує продуктивність дезінтегратора. Ще одним значним недоліком дезінтеграторів є швидке зношення пальців барабанів, а їх заміна є трудомісткою операцією [102].

Барабанні млини. Робочими елементами цих млинів є захищений броньованими плитами барабан і завантажені у нього подрібнювальні органи

(кулі, стрижні, морська галька і т. д.). Під час обертання барабана тіла відцентровою силою притискаються до його стінки, піднімаються на деяку висоту, а потім падають або скочуються вниз.

Недоліками барабанного млина є низький коефіцієнт корисної дії, високі витрати електроенергії, значний знос мелючих тіл і футеровки, велика металоємність і високий шум при роботі [103].

Молоткові дробарки. Основними робочими елементами молоткових подрібнювачів є ротор з молотками та статор – корпус. Під час подрібнення колова швидкість на кінцях молотків дробарки становить 70—90 м/с. Число обертів ротора (вала з дисками) дробарки –2100-3000 об/хв. Використовується в фармацевтичній промисловості.

Переваги молоткового млина: висока продуктивність; дрібна та однорідна фракція; ремонтпридатність; довговічність (використовується товстостінний метал). Швидке зношення молотків та відбійних плит є основним недоліком молоткових подрібнювачів [104].

Отже, для подрібнення біомаси пробіотичних дріжджів *S. boulardii* ATCC-MYA-796 здійснюється до розміру часточок 0,16 мм, для цього обираємо молотковий млин, адже даний спосіб подрібнення має вищу продуктивність відносно інших подрібнювачів та не несе негативного впливу на клітину.

5.2.5. Вибір способу просіювання та просіювача

Подрібнені лікарські засоби необхідно просіювати. У фармацевтичній промисловості робота сит оцінюється двома показниками: ефективністю просіювання або коефіцієнтом корисної дії.

На продуктивність сит та ефективність просіювання впливають фактори: форма і розмір отворів сітки, товщини шару матеріалу на ситі, його вологість, швидкість, характер руху матеріалу, довжина його шляху.

Форма отворів сіток може бути квадратна, кругла, прямокутна, що залежить від способу одержання сіток і матеріалу, з якого вони виготовляються.

Результат просіювання прямо залежить від тиску, під яким проходить порошок, від величини отворів сита, а також від тривалості і сили, з якими проводиться просіювання.

В результаті просіювання (через одне сито), вихідний матеріал поділяється на дві фракції: 1) *просів* (нижній продукт) – матеріал, що пройшов крізь сито; 2) *відсів* (верхній продукт) – матеріал, що не пройшов крізь сито і залишився зверху на ситі.

У фармацевтичній практиці застосовують обертальні, хитальні та вібраційні сита.

При просіюванні біомаси пробіотичних дріжджів зручно користуватися віброситом, оскільки воно, порівняно з іншими ситами, забезпечує більш високу продуктивність і чіткість розділення за меншої витрати енергії завдяки тому, що під час вібрування шар продукту на ситі інтенсивно розпушується, зменшується тертя між частинками; вони стають більш рухливими, що зумовлює відносний перерозподіл їх за розміром і прискорює виділення частинок на прохід [86].

5.2.6. Пакування, маркування та відвантаження

Для збереження якості готових лікарських засобів здійснюється пакування (первинна та вторинна упаковка). Важливим є вибір первинної упаковки, адже вона повинна якісно захищати сухі пробіотичні препарати від впливу різних зовнішніх факторів (температура, вологість навколишнього середовища та кисень), які здатні значно погіршити якість готового препарату впродовж процесу зберігання [105].

На сьогодні пробіотичні препарати у вигляді ліофілізованого порошку випускають у таких типах первинної упаковки:

- скляні флакони;
- пластикові флакони;
- багат шарові пакетики-саше [106].

Як первинну упаковку доцільно використовувати багат шарові пакетики-саше (по 250 мг порошку), оскільки вони забезпечують захист від вологи, проходження кисню всередину упаковки та світла на рівні зі склом, але при

цьому мають меншу вартість. Пакування здійснюється у пакувальному автоматі [107]. Матеріали, що використовуються для виготовлення саше - алюмінієва фольга різної товщини та полімери (поліпропілен і поліетилентерефталат) [108].

Дальше відбувається вторинна упаковка. Саше, в кількість 10 шт, упаковують разом з інструкцією в пачки. На пачці вказується назву препарату латинською, українською та на інших мовах, виробник, вміст діючої речовини, перелік допоміжних речовин, об'єм препарату в пакетику-саше, умови зберігання, реєстраційний номер, номер серії, термін придатності, штриховий код. Пакування здійснюється у пакувальному автоматі.

Наступним етапом є упаковка в гофрокороб, по 50 пачок в кожний та заклеювання пакувальною стрічкою. Здійснюється вручну. Упакована продукція транспортується на склад.

5.3. Обґрунтування фармацевтичної складової проєкту

5.3.1 Обґрунтування вибору «чистих» приміщень

Згідно GMP 2016 року [109] до виробництва пробіотичних препаратів пред'являються особливі вимоги, щоб звести до мінімуму ризик контамінації.

Чисті зони класифікують відповідно до необхідних характеристик навколишнього середовища. Кожна виробнича операція вимагає відповідного рівня чистоти навколишнього середовища в експлуатованому стані для зведення до мінімуму ризику контамінації частками або мікроорганізмами продукції чи оброблюваних матеріалів.

Для відповідності вимогам в умовах «експлуатації» ці зони мають бути спроектовані так, щоб забезпечити точно визначений рівень чистоти повітря в «оснащеному» стані. «Оснащений» стан – це умова, за якої система чистого приміщення цілком підготовлена, виробниче обладнання цілком встановлене і готове до роботи, але персонал відсутній. «Експлуатований» стан – це умова, за якої система чистого приміщення й обладнання функціонують у встановленому режимі з визначеною кількістю працюючого персоналу. «Експлуатований» стан та «оснащений» стан мають бути встановлені для кожного чистого приміщення або комплексу чистих приміщень [109].

Виділяють чотири класи чистоти:

- Клас А: Локальна зона для операцій, що становлять високий ризик для якості продукції, наприклад: зони дозування, закупорювання ємностей, відкривання ампул і флаконів, змішування в асептичних умовах. Як правило, такі умови забезпечуються ламінарним потоком повітря на робочому місці. Системи ламінарного потоку повітря мають забезпечувати рівномірну швидкість повітря в діапазоні 0,36-0,54 м/с (керівний норматив), що застосовне до відкритого робочого місця в чистій кімнаті. Підтримування ламінарності має бути доказаним та валідованим. У закритих ізоляторах та боксах із рукавичками можна використовувати односпрямований потік повітря із меншими швидкостями [109].
- Клас В: Навколишнє середовище для зони класу А у разі виготовлення і наповнення в асептичних умовах [109].
- Класи С і D: Чисті зони для здійснення менш критичних стадій виробництва продукції [109].

Клас чистоти для підготовки інокуляту та виробничого біосинтезу дріжджів *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 – В із зоною А [30].

Для виділення біомаси *S. boulardii* ATCC-MYA-796 на етапі відділення, сушіння, подрібнення, просіювання та пакування в первинну упаковку обираємо клас чистоти С, оскільки транспортування від однієї технологічної стадії до іншої здійснюється за рахунок ручного перенесення, тобто продукт буде контактувати безпосередньо з навколишнім середовищем [30].

Нормована кількість мікроорганізмів - не більше ніж 10 КУО/м³ повітря для класу чистоти В, та 100 КУО/м³ – для класу С. Максимально допустима кількість часточок в 1 м³ повітря в оснащеному стані класу В: 0,5 мкм – 3 500; 5,0 мкм – 0, в експлуатаційному: 0,5 мкм – 350 000; 5,0 мкм – 2 000. В оснащеному стані класу чистоти С: 0,5 мкм – 350 000; 5,0 мкм – 2 000, в експлуатаційному: 0,5 мкм – 3 500 000; 5,0 мкм – 20 000. Для маркування і пакування у групову тару клас чистоти не класифікується [30].

5.3.2. Обґрунтування підготовки вентиляційного повітря

Згідно GMP [109] виділення біомаси пробіотиків повинен проводитись при подаванні очищеного вентиляційного повітря. Тому для підтримки належного ступеня чистоти повітря повинне проходити очищення з використанням фільтрів відповідної ефективності. Для приміщень (зон), що відносяться до класів чистоти А, В і С запропонована щонайменше трьохступеневе очищення, для класу чистоти D – щонайменше двоступеневе.

Оскільки підготовка інокуляту, виробничий біосинтез та виділення біомаси *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 здійснюється у класі чистоти В (із зоною А) та С [30], то триступінчасте очищення повітря за допомогою фільтрів грубого, тонкого і індивідуального очищення дозволяє досягти необхідного результату. Установка перед кожною фільтрувальною групою фільтрів більше низького щабля очищення у вигляді попереднього блоку очистки подовжує загальний термін служби основних фільтрів [110].

У чистих кімнатах цього класу, як правило, використовується однонаправлений (ламінальний) потік повітря. Це досягається установкою фільтрів HEPA/ULPA по всій площі стелі і фальшпідлоги (підлога з перфорацією). Повітря рухається вертикально від стелі до підлоги, видаляється через перфорацію у витяжну камеру під підлогою. Потім рециркуляційне повітря по периферійним рециркуляційним повітроводам знову подається в приміщення [111].

HEPA фільтр є ключовою ланкою системи, від якої залежить ефективність роботи всієї повітроочисної станції. Ефективне використання HEPA фільтрів можливо тільки за умови триступінчатої (щонайменше) фільтрації повітря, що подається, де кожний із ступенів вирішує свою специфічну задачу [110]:

- Перший ступінь фільтрації захищає систему підготовки повітря від забруднень, що містяться в зовнішньому (атмосферному) повітрі, що подається в блок підготовки повітря.
- Другий ступінь фільтрації забезпечує чистоту приточувань повітроводів від забруднення і розташовується як останній елемент системи підготовки повітря.

- Третій ступень - саме HEPA фільтр, що забезпечує чистоту повітря та поступає безпосередньо в приміщення [110].

Фільтри, як було зазначено у підрозділі 5.1.2 розділяються на групи: G (фільтри грубого очищення), F (фільтри тонкої очистки), H (фільтри абсолютної очистки) та U (фільтри остаточного очищення).

Для очистки вентиляційного повітря для класів чистоти B (із зоною A) та C доцільним є використання фільтрів панельного типу EU4, EU9 та фільтр HEPA H14 [74, 75, 69].

5.3.3. Обґрунтування водопідготовки

Вода є продукцією, що найбільш широко використовується в фармацевтичній галузі з різною метою: як допоміжна речовина в складі лікарських засобів і як розчинник для підготовки препаратів до застосування, як розчинник при синтезі активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) і виробництві лікарських засобів, як очищувальний засіб для промивки й очищення обладнання, первинних пакувальних матеріалів тощо. Вимоги до якості води залежать від її призначення і встановлені у фармакопейних монографіях. Виробництво та контроль якості води, що використовують при виробництві лікарських засобів, входять до сфери дії належної виробничої практики (GMP) [112].

У Європейській Фармакопеї та Державній Фармакопеї України містяться вимоги до таких категорій води [112]:

- Вода для ін'єкцій (Water for Injections)
- Вода очищена (Purified Water)
- Вода високоочищена (Highly Purified Water)

Під час технологічного процесу виробництва пробіотичного препарату «Ентерол» на основі біомаси дріжджів *S. boulardii* ATCC-MYA-796 вода використовується для миття/дезінфекції та ополіскування обладнання та приміщення, для приготування піногасника, титрувальних агентів, поживного та захисного середовищ. Миття приміщення проводиться водою питною. Початкове промивання обладнання здійснюється водою питною, а заключне - водою очищеною. Для піногасника, титрувальних агентів та композиції Б, які

готуються в лабораторії, використовується вода дистильована, для приготування поживного середовища – питна, окрім Б композиції для колб, як було зазначено вище. Для приготування захисного середовища використовується вода очищена.

Вода питна не описана у монографії фармакопеї, але вона має відповідати вимогам державних санітарні норм і правил ДСанПіН 2.2.4-171-10. Для підтвердження якості води на виробничій дільниці слід проводити випробування. Вода питна може бути використана у процесах хімічного синтезу та на ранніх стадіях очищення обладнання фармацевтичних виробництв, якщо відсутні особливі технічні вимоги або вимоги щодо застосування води більш високих категорій якості. Вода питна є прийнятим джерелом вихідної води для одержання води фармакопейної якості [112].

Вода очищена — це вода для виготовлення лікарських препаратів, при виробництві яких до води не висувають вимоги щодо стерильності та/або апірогенності. Вода очищена, що задовільно пройшла випробування на ендотоксини, може бути використана при виробництві розчинів для діалізу.

Виробництво. Оскільки схема підготовки води очищеної є стандартною, включає в себе такі стадії, як фільтрування крізь вугільний фільтр (адсорбція органічних матеріалів з низькою молекулярною вагою, що окислюють добавки, хлор і видаляють їх з води), іонний обмін (дифузія іонів розчиненого електроліту до поверхні сорбенту, подальша дифузія іонів розчиненого електроліту всередину сорбенту, витіснення рухомого іона сорбенту зі сфери впливу катіонного (аніонного) комплексу сорбенту і дифузії витісненого рухомого іона з фази сорбенту в розчин) та зворотній осмос (процес переходу води з розчину через напівпроникну мембрану під дією зовнішнього тиску), то наведення її в технологічній частині не передбачається [113, 114].

5.3.4. Обґрунтування вибору миючих та дезінфікуючих засобів

Для миття доцільно здійснювати розчин «Хлорантоїн» (0,2%) – це хлорактивний, багатокомпонентний, поліфункціональний миючий засіб, який не ушкоджує об'єкти, виготовлені з металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу і устаткування з лакофарбовими,

гальванічними і полімерними покриттями, добре емульгують жири, видаляють білково-жирову плівку з оброблюваних поверхонь, легко з них змиваються, не залишаючи нальоту. «Хлорантоін» має бактерицидні, туберкульозні, віруліцидні, спороцидні та фунгіцидні властивості [115, 116].

Для запобігання резистентності слід змінювати «Хлорантоін» раз на 3 місяці на «**Біомой**» (0,3%), який є багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб, теж не викликає корозії. Виявляє високу миючу активність при температурі не вище $(40 \pm 5) ^\circ\text{C}$ [117, 118].

Опрацювавши «Державний реєстр дезінфекційних засобів» для дезінфікації **обладнання, устаткування, тари та інвентарю** обираємо такі засоби, які використовують на фармацевтичних підприємствах, а саме: «Дезанол оксо», «PROFI CHLOR», «DR OXY–STERIL 15» та «Гексакварт XL» [119].

«DR OXY–STERIL 15» - незважаючи на низьку ціну, широкий спектр антимікробної дії та є екологічну безпечність даного препарату ми не можемо його використовувати, оскільки він містить в своєму складі перекис водню, що характеризується низькою ефективністю щодо більшості мікроорганізмів. До того ж перекис водню знебарвлює і руйнують оброблювані матеріали, викликають корозію металевих деталей устаткування, що робить їх не прийнятними для використання на багатьох об'єктах.

«Гексакварт XL» у своєму складі містить ЧАС, які мають недостатню активність щодо грамнегативних бактерій, збудників туберкульозу, пікновірусів, псевдомонад і мукоїдних штамів стафілококів. Крім природної стійкості до ЧАС в деяких мікроорганізмів спостерігається швидке звикання до дії цих препаратів. Крім цього, відомі випадки, коли засоби на основі ЧАС викликали алергійні реакції в людей.

Проаналізувавши склад (активна речовина), спектр антимікробної дії, область застосування, клас токсичності, вартість можна зробити висновок, що доцільно буде використовувати «**PROFI CHLOR**», оскільки він є хлорактивним препаратом, тобто має високу ефективність щодо більшості мікроорганізмів. Не

зважаючи на високу вартість засобу характеристики, які наведено вище в описі засобу надають йому перевагу.

З метою запобігання розвитку та розповсюдженню стійких варіантів мікроорганізмів рекомендується чергувати дезінфікуючі та антисептичні засоби кожні 1–3 місяці. То на заміну обираємо «Дезанол оксо» з діючою речовиною - перекисом водню [119].

Для дезінфекції приміщень, а саме підлоги, стін, вікон, дверей використовують такі засоби, як «Sviteco PIP Interior Cleaner», «Дезанол оксо», «ЛАСЕПТ Форте», «ЛАСЕПТ 344М», «DR FOAM FLUX», «PROFI CHLOR», «Гексакварт XL» [119].

Для даного виробництва обираємо «ЛАСЕПТ Форте», оскільки він містить глутаровий альдегід, як діючу речовину, що широко використовуються для дезінфекції як приміщень, так і повітря, оскільки ефективні проти бактерій, вірусів, грибів. Проте вони належать до сильних алергенів, що різко обмежує їхнє застосування, при попаданні на шкіру вони викликають хімічні опіки.

З метою запобігання резистентності мікроорганізмів обираємо деззасіб «DR FOAM FLUX», він відповідає всім нормам, які повинен мати деззасіб [119].

Для гігієнічної обробки **рук персоналу** на фармацевтичному виробництві можна використовувати такі дезінфекційні та антисептичні засоби, як «ФАСЕПТ», який у своєму складі має спирт ізопропіловий та спирт пропіловий, «СЕПТАНОЛ Екстра» (містять у різних концентраціях спирт етиловий та перекис водню), «ELENPHARM SANITIZER» (діюча речовина: 0,5% полігексаметиленгуанідин гідрохлориду), а також засіб дезінфекційний «СептиВір» (д.р.: бензалконію хлорид (ЧАС) 0,025%, спирт ізопропіловий 50-70%, спирт пропіловий - 25%) [119].

Для даного виробництва обираємо «СЕПТАНОЛ Екстра», оскільки він у своєму складі містить спирт етиловий та перекис водню, які, на відміну від ЧАС-вмісних засобів не викликають алергічної реакції та мають вищий дезінфікуючий ефект. На заміну, для запобігання резистентності, обираємо хлорактивний препарат «ELENPHARM SANITIZER» [119].

5.4. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

1. Обґрунтовано вибір таких післяферментаційних стадій:

ТП 9. Відділення біомаси

ТП 9.1 Центрифугування культуральної рідини

ТП 10. Стабілізація клітин

ТП 10.1 Додавання захисного середовища

ТП 11. Сушіння цільового продукту

ТП 11.1. Сушіння у псевдозрідженому шарі

ТП 12. Подрібнення

ТП 12.1 Подрібнення на молотковому млині

ТП 13. Просіювання

ТП 13.1 Просіювання на віброситі

ПМВ 14. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 14.1. Фасування та первинна упаковка ліофільно висушеної біомаси у пакетики саше

ПМВ 14.2. Вторинна упаковка пакетиків саше у пачки

ПМВ 14.3. Упаковка пачок у гофрокороб та відвантаження

2. Вихідні дані:

а. об'єм культуральної рідини з однієї ферментації - $V_{кр} = 128$ л; КП «Основи проектування»

б. концентрація біомаси у КР $C_{БМ} = 8,2$ г/л ($=8,2$ кг/м³) – АСБ,

с. втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 20% початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає $128 \text{ л} \times 8,2 \text{ г/л} = 1,05 \text{ кг}$; після додавання захисного середовища на стадії ліофілізації (30%) кількість біомаси має складати 1,365 кг; кінцева кількість (з урахуванням 20% втрат) має становити 1,092 кг;

3. Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у таблиці

Таблиця 5.2.

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п / п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 20 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 9. Відділення біомаси						
1	ТП 9.1 Центрифугування культуральної рідини (128 л)	Біомаса	1,05 кг (8,2×128)- АСБ, з урахуванням 90% вологості 10,5 кг	525 г (5%)	9,975 кг	Центрифугування при 5 000 об/хв впродовж 15 хв
		Супернатант	128 л (128-10,5)	-	117,5 л	-
ТП 10. Отримання напівфабрикату						
2	ТП 10.1 Змішування біомаси з захисним середовищем	Біомаса	9,975 кг	-	12,965 кг	Збірник з перемішуючим пристроєм для біомаси об'ємом 15 л
		Захисне середовище: Сахароза Жалатоза Агар	Захисне середовище – 30% від біомаси дріжджів – 2,99 кг 10% сахарози – 0,299 кг 10% желатози – 0,299 кг 0,02 % агару- 0,0006кг	-		

	ТП 11. Отримання сухої біомаси					
3	ТП 11.1. Ліофільне висушування біомаси	Волога біомаса (вологість 90 %)	12,965 кг(у перерахунку на АСР – 1,297 кг, з урахуванням 4 % вологи – 1,348 кг)	-	-	Ліофільна сушарка з кількістю полиць - 4 шт
		Висушена біомаса (вологість 4%)	-	0,054 кг (4%)	1,295 кг (1,348-0,054)	-
	ТП 12. Подрібнення ліофільно висушеної біомаси					
4	ТП 12.1 Подрібнення біомаси молотковою дробаркою	Висушена біомаса	1,295 кг	-	-	Продуктивність подрібнювача – 30 кг/год (розрахунок на 3 хв роботи)
		Подрібнена біомаса	-	0,039 кг (3 %)	1,256 (1,295-0,039)	-
	ТП 13. Просіювання подрібненої біомаси					
5	ТП 13.1 Просіювання біомаси на вібраційному ситі	Подрібнена біомаса	1,256	-	-	Вібраційне сито з діаметром – 450 мм
		Просіяна біомаса	-	0,05 кг (4%)	1,206 (1,256-0,05)	-

ПМВ 14. Упаковка готового продукту						
6	ПМВ 14.1. Фасування та первинна упаковка ліофільно висушеної біомаси у пакетики саше	Просіяна біомаса	1,206 кг	-	-	Фасувально-пакувальна лінія потужністю до 110 шт/хв (розрахунок на 43 хв роботи)
		Упакований у саше (по 250 мг) цільовий продукт	-	0,036 кг (3%)	1,17 кг = 1 170 000/250 = 4 680 саше	
7	ПМВ 14.2. Вторинна упаковка пакетиків саше у пачки	Упакований у саше (по 250 мг) цільовий продукт	4 680 саше	-	-	Автоматична машина для упаковки штучних товарів в коробку Продуктивність: 80 шт/хв (розрахунок на 58 хв роботи)
		Пачки з саше по 10 шт в кожній	-	(0,5 %)	4 657 саше/ 10 саше в пачці = 465 пачок	
8	ПМВ 14.3. Упаковка пачок у гофрокороб та відвантаження	Пачки з саше по 452 шт в кожній	465 пачок	-	-	-
		Гофрокороб по 50 пачок в коробці	-	(0,5 %)	462/50=9 гофро коробок	

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу біомаси дріжджів

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)	Джерело
1	2	3	4	5
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник airer deltafan maxi, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень. Продуктивність [м3/ч] 1100 – 1800. Перепад тиску [Pa] 25 – 40.	[120]
Ф-2, Ф-8	Фільтр грубої очистки	2	Фільтр G4 (EU4) – кінцевий перепад тиску 250 Па, середня утримуюча здатність (Am) синтетичного пилю 65 - 90%. Фільтруючий матеріал - целюлоза, голкопробивні неткані волокна, скло чи мікроскловолокно . Виробник Alter Air (Україна)	[121]
Ф-3 Ф-13	Фільтр тонкої очистки	2	Фільтр F9 (EU9) – рекомендований кінцевий перепад тиску 450 Па, мінімальна ефективність (частки 0,4 мкм) – 95 %. Фільтруючий матеріал – хімволокно, скловолокно, металева сітка, етикульований пінополіуретан, целюлоза, голкопробивні неткані волокна. Виробник Alter Air (Україна)	[122]
В-4	Вентилятор	1	Центробіжний вентилятор ВЦ 14-46-2,5 Вентилятор середнього тиску - для переміщення чистого повітря в системах вентиляції. Тип електродвигуна – АІР Продуктивність: 720 - 1900 м ³ /ч. Повний тиск: 310-371 даПа. Частота обертів – 1500 об/хв. Діаметр робочого колеса: 250 мм. Виробник – Вент-Завод (Україна)	[123]

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Зомчак В.В.						71	142
Перевір.	Грегірчак Н.М.							
Консультант								
Н.Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.					Кафедра БТМ		

T-5 T-10	Теплообмінник к охолоджувач	2	Теплообмінник WHE 2050 Потужність - 46,5 кВт; Пропускна здатність – 190 л/хв, охолоджувальна - 46 кВт/год. Виробник - «PASKAL» (Туреччина, Італія)	[124]
T-6	Теплообмінник– нагрівач	1	Теплообмінник КС 1750 Кількість повітря - 4500 м3/год, тепла потужність - 45 кВт. «Виробнича компанія Галактик» (Україна)	[125]
Ф-7	Фільтри індивідуальної очистки	3	НЕРА фільтр від компанії NEW FILTER (Україна). Клас фільтру – Н 14, ступінь очищення повітря фільтром не нижче 99,995%. Пропускна здатність- 2000 м ³ Фільтрувальний матеріал – ультра - і мікротонкі скляні волокна, упакованого в вигляді дрібних складок (мінігофр), розділених термопластичними або алюмінієвими сепараторами.	[126]
К- 9	Компресор	1	Компресор ATMOS модель: Albert E 40 (Чехія). Тип компресора – гвинтовий, потужність - 4 кВт, продуктивність - 0,5 м ³ /хв, Тиск- 9 бар.	[127]
P-11	Ресивер	1	Ресивер повітряний горизонтальний РГ 50.294. Робочий тиск – 1,0 МПа, Місткість – 0,05 м3. ТОВ "Сервісна компанія" Конгур (Україна)	[128]
T-12	Теплообмінник– нагрівач	1	Теплообмінник КС 1750 Кількість повітря - 4500 м3/год, тепла потужність - 45 кВт. «Виробнича компанія Галактик» (Україна)	[129]
P-14	Реактор- змішувач для приготування та стерилізації композиції А для посівного апарата	1	Реактор-змішувач об'ємом 20 л. Виробник: BIOSTAT® Cplus (Україна). *Габарити ферментера (ДхВ): 335 x 440 мм. Швидкість обертання мішалки: 20-1000 об / хв. Тиск – від 0,5 до 2 бар. Обладнаний сорочкою Потужність двигуна: 1200 Вт. Нержавіюча сталь	[130, 131]

Ф-15 Ф-22	Фільтри індивідуально ї очистки	3	НЕРА фільтр від компанії NEW FILTER (Україна). Клас фільтру – Н 14, ступінь очищення повітря фільтром не нижче 99,995%. Пропускна здатність- 270 м3 Фільтрувальний матеріал – ультра - і мікротонкі скляні волокна, упакованого в вигляді дрібних складок (мінігофр), розділених термопластичними або алюмінієвими сепараторами.	[125]
ФР-16	Ферментер (посівний апарат)	1	Пілотний ферментер серії BIORUS-SJA об'ємом 25 л Виробник - BIORUS® (Білорусь). *Габарити ферментера (ДхВ): 450 x 505 мм. Робочий тиск: 0,3 МПа. Виконаний з нержавіючої сталі - марки AISI 316L для поверхонь, що контактують з продуктом, AISI 304 - для що не контактують з продуктом поверхонь (сорочка судини, зовнішня оболонка та інше). Контроль і управління параметрами в стандартній комплектації - швидкість мішалки (20 - 1000 об / хв), температура, рН, рО2, датчик піни. Автоматична подача лугу. Обладнаний барботером, відбивними перегородками. Наявна стерильна система відбору проб через спеціальний пробовідбірний клапан.	[132, 133]
Д-17	Ваговий дозатор	1	Двопотіковий ваговий дозатор для сухих порошкоподібних компонентів фірми «Техноаги» (Україна). Діапазон: 50 – 5000 г; продуктивність до 10 доз/хв; дискретність зважування – 0,1г	[134]
РЗ-18	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А для ферментера	1	Реактор-змішувач об'ємом 100 л Виробник: Промвіт (Україна) Габарити реактора (ДхШхВ): 1200 x700x1600 мм. Тиск в корпусі, Бар : 3,0 Потужність двигуна, кВт : 0,56 Число обертів мішалки – від 200 до 400 об/хв. Сталь AISI 316L, сталь AISI 304	[135]

Н-19	Перистальтичний насос	1	Перистальтичний насос ВНЗ-V Виробник: ETATRON (Україна) Продуктивність – 100 л/год. Матеріал робочого шланга - Norprene® Шлан - 9,6x15,9мм, 28см	[136]
3-20	Збірник для приготування композиції Б для ферментера	1	Збірник на 40 л фірми МашХім (Росія). Потужність приводу – від 0,75 до 1,5 кВт; число обертів мішалки – від 25 до 3000 об/хв. Габарити ферментеру (ДхВ): 566 x 1105мм. Також передбачений температуриний датчик, монometr.	[137]
Н-21	Відцентровий насос	1	Відцентровий Насос Pedrollo Виробник: АКВАВІН (м. Вінниця, Україна) Потужність - 1,5 кВт; Максимальний підйом - 65 м; Глибина всмоктування - до 7 м; Максимальна продуктивність - 100 л/хв; Діаметр всмоктуючого патрубку - 1¼; Діаметр подаючого патрубку – 1	[138]
ФР-23	Ферментер	1	Промисловий ферментер серії BIORUS-SJA об'ємом 250 л. Виробник - BIORUS® (Білорусь). * Габарити ферментеру (ДхВ): 1020 x 2035 мм. Робочий тиск: 0,3 МПа. Виконаний з нержавіючої сталі - марки AISI 316L для поверхонь, що контактують з продуктом, AISI 304 - для поверхонь (сорочка судини, зовнішня оболонка та інше). Контроль і управління параметрами в стандартній комплектації - швидкість мішалки (20 - 1000 об / хв), температура, рН, рО ₂ , датчик піни. Автоматична подача лугу. Обладнаний барботером, відбивними перегородками. Наявна стерильна система відбору проб через спеціальний пробовідбірний клапан.	[137, 139]
Н-24, 26	Перистальтичний насос	2	Перистальтичний насос МР-8118.12 Виробник: VIKAQUAЕЕ (Україна) Продуктивність – 352 л/год Тиск: 0-1,4 бар Аспірація: 8 тса Матеріал робочого шланга - Norprene® Трубка 12.7 – 3.2	[140]

3-25	Збірник культуральної рідини	1	Збірник культуральної рідини об'ємом 150 л. Виробник «СНЕМАР АГ» (Швейцарія) Оснащений рубашкою та мішалкою Нержавіюча сталь Габаритні розміри(ДхШхВ), мм: 845х838х1350	[141]
Ц-27	Центрифуга	1	Центрифуга ОГШ-202К-03 Максимальна частота обертання - 6 000 об/хв. Габаритні розміри (з віброізоляцією) (Д*Ш*В): 1490*860*490 мм. Виробник - Сумське НПО (Україна)	[142]
РЗ-28	Реактор-змішувач для захисного середовища	1	Реактор-змішувач об'ємом 15 л. Виробник: REATORG TECHNOLOGIES™ (Росія). Габарити реактора (Ш х ГхВ): 770 х 1040 х 2506 мм. Обладнаний мішвалкою та сорочкою. Тиск – 0,5 бар. Матеріал – боросилікатне скло	[143]
С-29	Ліофільна сушарка	1	Ліофілізатор Біо- Rus 4 SFD Ємність конденсора - 4 літри льоду Мінімальна температура - До -44 °С Матеріал конденсора - Нержавіюча сталь Сушильна камера - Нержавіюча сталь Кількість полиць - 4 шт Розмір полиць, см - 20,7 (Ш) * 46 (Г) Відстань між полицями, см - 5,3 Максимальна температура нагріву полиць - 52 °С. Зовнішня поверхня - Нержавіюча сталь/алюміній з порошковим покриттям Мережа -10А,220В.Потужність -2, 35КВт Дисплей - повноколірний сенсорний екран. Управління - Ручне / автоматичне Фреон - R410А Вакуумний насос - 7 CFM безмасляний	[144]
М-30	Молоткова дробарка	1	Молоткова дробарка YF8-1 Тип подрібнення - ударний Продуктивність – 30-50 кг/годину Кількість звт, розмір звт – 4 шт: 6 мм, 250, 177, 149, 105 мікрон Кількість оборотів – 2800 об/хв Напруга – 220 Вольт Потужність – 3 кВт Вага - 65 кг Розміри (Д*Ш*В) - 580*360*480мм Країна виробник – Китай	[145]

В-31	Вібросито	1	Вібраційне сито SWECO Модель LS18_55 (2 фракції) Діаметр сита – 450 мм Розмір часточок – до 30 мкм Кількість звт, розмір звт – 4 шт: 6мм, 250, 177, 149, 105 мікрон Матеріал - вуглецева та нержавіюча сталь 304 та 316 [61]	[146]
АВ-32	Установка для первинної упаковки	1	Горизонтальна машина для фасування і упаковки в саше Модель S110 Можлива ширина «саше», мм 40 - 110 Можлива довжина «саше», мм 40 - 150 Максимальний обсяг «саше», см ³ 75 Продуктивність - 110 шт/хв Максимальний діаметр котушки з плівкою, мм 300 Максимальна ширина плівки, мм 300 Внутрішній діаметр бобіни, мм 70/76 Споживана потужність, кВт (залежить від комплектації) 2 Габаритні розміри: 1300×1400×2400 мм	[147]
АВ-33	Установка для вторинної упаковки	1	Автоматична машина для упаковки штучних товарів в коробку Продуктивність: 80-100 шт/хв Габарити, мм (Д х Ш х В):3500х1500х1650 Тип тари: Картон. Потужність:1,5 кВт Напруга: 380 В	[148]

Примітка.* - розміри взято для збірника аналогічного об'єму.

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічний процес біосинтезу біомаси дріжджів *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 для одержання препарату «Ентерол» складається із допоміжних робіт, технологічного процесу, пакування, маркування та відвантаження, а також знешкодження відходів.

Допоміжні роботи (ДР) це підготовка повітря (вентиляційне та аераційне), санітарна підготовка виробництва, яка включає в себе підготовку персоналу, приміщень, обладнання, приготування мийно-дезінфікуючих розчинів, підготовка піногасника, титрувальних агентів, приготування та стерилізація поживних середовищ, а також приготування захисного середовища.

До основного технологічного процесу (ТП) відносять підготовку посівного матеріалу, біосинтез та стадії відділення біомаси, змішування з захисним середовищем, висушування біомаси, подрібнення, просіювання.

Пакування, маркування та відвантаження (ПМВ) – фасування, первинна упаковка, вторинна упаковка, а також упаковка готового продукту в гофрокороб.

Знешкодження відходів (ЗВ) – знешкодження рідких, твердих та газоподібних відходів.

ДР 1. Підготовка повітря

ДР 1.1 Підготовка вентиляційного повітря

ДР 1.1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря відбувається на рівні 3 м, здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрозабірником (ПЗ -1).

ДР 1.1.2. Грубе очищення повітря

В якості фільтрів попереднього очищення використовують панельні повітряні фільтри для грубого очищення G4 (EU4) (Ф-2). Як фільтрувальний матеріал використовується целюлоза, голкопробивні неткані волокна, скло чи міроскловолокно.

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми			Літ.	Арк.	Акрушів	
Розроб.		Зомчак В.В.									
Перевір.		Грегірчак Н.М.								77	142
Консультант								Кафедра БТМ 79			
Н.Контр.											
Затверд.		Пирог Т.П.									

Фільтр орієнтований на ефективне видалення крупних фракцій контамінантів з повітря, які можуть пошкодити компресійне обладнання. Ступінь очищення становить $E = 80 \%$.

ДР 1.1.3. Очищення повітря в головному фільтрі

Подальше очищення повітря відбувається у головному фільтрі (Ф-3). Для головних фільтрів використовуються панельні фільтри тонкого очищення виготовляють з різних матеріалів: хімволокно, скловолокно, металева сітка, ретикульований пінополіуретан, целюлоза, голкопробивні неткані волокна. Повітря очищається від пилу та мікроорганізмів (частки 0,4 мкм). Ступінь очищення становить $E = 95\%$.

ДР 1.1.4. Стабілізація термодинамічних показників

На цій стадії повітря передається вентилятором (В-4) до кожухотрубного теплообмінника (Т-5), охолоджується з використанням хладагенту фреону або нагрівається до 21–23 °С теплообмінником-нагрівачем (Т-6) залежності від пори року (температури навколишнього середовища), коли проводиться забір повітря. Вологість повітря має становити 30-60%.

ДР 1.1.5. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Повітря від головних фільтрів подається безпосередньо до індивідуальний фільтр (Ф-7). При цьому повітря очищають до ступеня очищення $E = 99,995\%$. Для цього використовується фільтр типу HEPA класу Н 14. Після очистки вентиляційне повітря подається до приміщень.

ДР 1.2. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.2.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря відбувається на рівні 3 м, здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрозабірником (ПЗ -1).

ДР 1.2.2. Грубе очищення повітря

В якості фільтрів попереднього очищення використовують панельні повітряні фільтри для грубого очищення G4 (EU4) (Ф-8). Як фільтрувальний матеріал використовується целюлоза, голкопробивні неткані волокна, скло чи мікроскловолокно. Фільтр орієнтований на ефективне видалення крупних фракцій контамінантів з повітря, які можуть пошкодити компресійне обладнання. Ступінь очищення становить $E = 80 \%$.

ДР 1.2.3. Стиснення повітря

Стиснення повітря здійснюється у компресорі ATMOS (К-9) при тиску 0,9 МПа, при цьому температура може підніматися до 200°C і збільшується вміст вологи.

ДР 1.2.4. Охолодження повітря

Щоб забезпечити випадання вологи в краплеуловлювачі, повітря «переохолоджують» до температури 25 – 40 °C в теплообміннику-охолоджувачі WHE 2050 (Т-10).

ДР 1.2.5. Видалення вологи

Видалення конденсованої вологи ($W = 60\text{--}70\%$) та парів мастила, що потрапили з компресора (К-9), здійснюється у ресивері (Р-11), також тут відбувається зменшення пульсацій руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря.

ДР 1.2.6. Нагрівання повітря

Для забезпечення надійної роботи головного і індивідуального фільтрів - стабілізація показників (тиск, температура), повітря нагрівають до температури до 45-50°C, $W = 50 \%$ в теплообміннику-нагрівачі КС 1750 (Т-12).

ДР 1.2.7. Очищення повітря в головному фільтрі

Подальше очищення повітря відбувається у головному фільтрі (Ф-13). Для головних фільтрів використовуються панельні фільтри тонкого очищення виготовляють з різних матеріалів: хімволокно, скловолокно, металева сітка, ретикульований пінополіуретан, целюлоза, голкопробивні неткані волокна. Повітря очищається від пилу та мікроорганізмів (частки 0,4 мкм). Ступінь очищення становить $E = 95\%$.

ДР 1.2.8. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Повітря від головних фільтрів через трубопроводи (колектори) подається безпосередньо до індивідуальних фільтрів (Ф - 15, Ф - 22), встановлених на ферментері. При цьому повітря очищають до ступеня очищення $E = 99,995\%$. Для цього використовується фільтр типу НЕРА класу Н 14. Очищене повітря до ДР 2.4.4, ТП 7.5 та ТП 8.1.

ДР 2. Санітарна підготовка виробництва

ДР 2.1 Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів

ДР 2.1.1. Підготовка робочого розчину 1% «Хлоратоїн» та 0,3% «Біомой»

Для миття використовуємо 1 % розчин «Хлоратоїну». На технічних вагах зважують 10 г «Хлоратоїну». Наважку переносять у емальовану ємність об'ємом 2 л, додають 990 мл води питної, перемішують та закривають кришкою.

Щоб запобігти виникненню резистентних мікроорганізмів до «Хлоратоїну», на зміну використовуємо 0,3% робочий розчин «Біомой».

Для приготування 0,3 % розчину «Біомой» на технічних вагах зважують 3г «Біомою». Наважку переносять у емальовану ємність об'ємом 2 л, додають 997 мл води питної, перемішують та закривають кришкою.

Далі розчин подається до ДР 2.3.1, ДР 2.3.2., ДР 2.4.1, тара до ЗВ 15.2.

ДР 2.1.2. Підготовка робочого розчину 0,3% «PROFI CHLOR» та 1% «Дезанол оксо»

Для дезінфекції обладнання використовується «PROFI CHLOR» (0,3%). На технічних вагах зважують 3 г «PROFI CHLOR». Наважку переносять у емальовану ємність (без пошкодження емалі), скляну або пластмасову ємність об'ємом 2 л, додають 997 мл води питної, перемішують та закривають кришкою.

Для запобігання резистентності на заміну «PROFI CHLOR» використовують «Дезанол оксо» (1,0%).

Щоб приготувати 1,0% розчин «Дезанол оксо», на технічних вагах зважують 10 г «Дезанол оксо». Наважку переносять у емальовану ємність об'ємом 2 л, додають 990 мл води питної, перемішують та закривають кришкою.

Далі розчин подається до ДР 2.4.1, тара до ЗВ 15.2.

ДР 2.1.3. Підготовка робочого розчину «ЛАСЕПТ Форте» та «DR FOAM FLUX»

Для дезінфекції приміщень використовують розчин «ЛАСЕПТ Форте» (2,0 -4,0%), на заміну - «DR FOAM FLUX» (0,5 – 1,0%).

ДР 2.1.3.1. Підготовка робочого розчину «ЛАСЕПТ Форте» 2% та «DR FOAM FLUX» 0,5%

Для приготування 2%-вого розчину «ЛАСЕПТ Форте» на технічних вагах зважують 20 г сухого порошку «ЛАСЕПТ Форте». Наважку переносять у емальовану ємність (без пошкодження емалі), скляну або пластмасову ємність об'ємом 2 л, додають 980 мл води питної, перемішують та закривають кришкою.

Для приготування 0,5%-вого розчину «DR FOAM FLUX» на технічних вагах зважують 5 г сухого порошку «DR FOAM FLUX». Наважку переносять у емальовану ємність (без пошкодження емалі), скляну або пластмасову ємність об'ємом 2 л, додають 995 мл води питної, перемішують та закривають кришкою.

Далі розчин подається до ДР 2.3.1, тара до ЗВ 15.2.

ДР 2.1.3.2. Підготовка робочого розчину «ЛАСЕПТ Форте» 4% та «DR FOAM FLUX» 1,0%

Для приготування 4%-вого розчину «ЛАСЕПТ Форте» на технічних вагах зважують 40 г сухого порошку «ЛАСЕПТ Форте». Наважку переносять у емальовану ємність (без пошкодження емалі), скляну або пластмасову ємність об'ємом 2 л, додають 960 мл води питної, перемішують та закривають кришкою.

Для приготування 1,0%-вого розчину «DR FOAM FLUX» на технічних вагах зважують 10 г сухого порошку «DR FOAM FLUX». Наважку переносять у емальовану ємність (без пошкодження емалі), скляну або пластмасову ємність об'ємом 2 л, додають 990 мл води питної, перемішують та закривають кришкою.

Далі розчин подається до ДР 2.3.2., тара до ЗВ 15.2.

ДР 2.2. Підготовка персоналу

Дана стадія включає в себе: навчання, інструктаж персоналу та санітарно-гігієнічна підготовка персоналу.

ДР 2.2.1. Навчання та інструктаж персоналу

Не рідше 1 разу на квартал персонал проходить технологічний інструктаж за вимогами, які висуваються до нього при роботі на даному виробництві з відповідним записом у журналі.

Навчання персоналу забезпечує саме підприємство. На підприємстві існують такі види навчань:

1. Основне навчання: проводиться один раз на рік; персонал ознайомлюється з теорією і практикою;
2. Вхідне навчання: проводиться по мірі необхідності, коли на певну посаду приходить новий робітник;
3. Подальше навчання: здійснюється систематично.

Проводять інструктаж з техніки безпеки. Дані про ознайомлення фіксують у спеціальному документі.

ДР 2.2.2. Санітарна підготовка персоналу

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

Оскільки виробництво проходить в класі чистоти С, то одяг персоналу повинен відповідати вимогам. Головний убір повинен закривати волосся. Борода і вуса також повинні бути закриті. Потрібно носити костюм (суцільний або той, що складається з двох частин), який щільно облягає зап'ястя, з коміром-стойкою і відповідним взуттям або бахілами. Одяг і взуття не повинні виділяти волокна або частинок. Перед початком роботи персоналу необхідно помити руки водою з милом та обробити розчином «СЕПТАНОЛ Екстра», який не потребує попередньої підготовки, оскільки потрапляє на виробництво у вигляді робочого розчину.

Кожен працівник на підприємстві несе відповідальність за виконання правил особистої гігієни, за стан робочого місця, за виконання технологічних і санітарних вимог на своїй ділянці.

ДР 2.3 Підготовка приміщення

Виробничі приміщення повинні мати між собою технологічний зв'язок і розташовуватися за ходом технологічного процесу, не допускаючи перехрещення потоків сировини та готових виробів, чистого та використаного посуду, а також повинні бути створені відповідні умови для дотримання виробничої та особистої гігієни працюючим персоналом.

Для дотримання чистоти у виробничих приміщеннях встановлюють металеві або педальні бачки з кришками, а також корзини із полімерних матеріалів для збору санітарного браку та сміття. Бачки та корзини повинні щоденно очищатися, промиватися та дезінфікуватися дезінфікуючими засобами.

Забороняється зберігати у виробничих приміщеннях миючі, дезінфікуючі засоби, відходи, інвентар, які не мають безпосереднього відношення до виробничого процесу. Зберігання протирального інвентарю, миючих та дезінфікуючих засобів здійснюється в окремих приміщеннях. Інвентар (відра, щітки тощо) повинен бути маркірований і закріплений за виробничими, допоміжними і підсобними цехами.

ДР 2.3.1. Щоденне прибирання

Щоденне прибирання приміщень проводять після кожної зміни вологим способом: із приміщень видаляють готову продукцію, напівпродукти, відходи виробництва, невикористані матеріали.

Вологе прибирання приміщень проводять миючим засобом «Хлорантоїн» (0,2%) (від ДР 2.1.1) та дезінфікують засобом «ЛАСЕПТ Форте» (2,0 %) (від ДР 2.1.3.1), який чергують з препаратом «**DR FOAM FLUX**» (0,5%) кожен місяць для запобігання виникнення резистентності мікроорганізмів. Прибирання проводять в гумових рукавичках, гумових чоботах та фартусі.

Після закінчення вологого прибирання для знезараження повітря вмикають настінні або настельні бактерицидні лампи. На поверхні виробничих приміщень безпосередньо після дезобробки не повинно бути життєздатних мікроорганізмів.

Далі відпрацьований розчин до ЗВ 15.1.

ДР 2.3.2. Генеральне прибирання

Прибирання здійснюється один раз на тиждень або негайно на вимогу бактеріолога у випадку виявлення мікробної контамінації. Генеральне прибирання включає в себе миття та дезінфекцію всіх поверхонь виробничих приміщень.

Після обробки поверхонь розчином з миючим засобом «Хлорантоїн» (0,2%) (від ДР 2.1.1) всі поверхні миють гарячою водою і висушують або ретельно витирають до відсутності вологи, а потім проводять дезобробку. Для дезобробки приміщень при генеральному прибиранні застосовують «ЛАСЕПТ Форте» (4,0%) (від ДР 2.1.3.2), який чергують з препаратом «**DR FOAM FLUX**» (0,5%).

Для знезараження повітря після генерального прибирання вмикають бактерицидні лампи. На поверхні виробничих приміщень безпосередньо після дезобробки не повинно бути життєздатних мікроорганізмів.

Далі відпрацьований розчин до ЗВ 15.1.

ДР 2.4. Підготовка обладнання та комунікації технологічного обладнання

Підготовка обладнання включає комплекс заходів, що складається з ретельної очистки, миття та дезінфекції внутрішніх та зовнішніх поверхонь всього технологічного обладнання миючими та дезінфікуючими засобами.

У змивах з технологічного обладнання та інвентарю після обробки дезінфікуючими розчинами не повинно бути життєздатних мікроорганізмів.

ДР 2.4.1. Миття та дезінфекція обладнання

Миття обладнання здійснюється розчином засобом «Хлорантоїн» (0,2%) (від ДР 2.1.1) та дезінфікують розчином «PROFI CHLOR» (0,3%) (від ДР 2.1.2.), після закінчення кожного технологічного циклу.

Далі відпрацьований розчин до ЗВ 15.1.

ДР 2.4.2. Ополіскування обладнання

Після миття обладнання потрібно ополоснути, для цього необхідно промити все обладнання водою очищеною при температурі 30-40°C упродовж

10 хв., для відмивання від решток забруднення та залишків дезінфікуючого засобу.

Далі відпрацьований розчин до ЗВ 15.1.

ДР 2.4.3 Технічний огляд обладнання

Після миття та ополіскування ємнісного обладнання з метою виявлення можливих неущільнень в комунікаціях та запірній апаратурі проводять технічний огляд. У разі їх виявлення проводять підтягування різьбових з'єднань.

ДР 2.4.4. Перевірка обладнання на герметичність

Перевірку на герметичність проводять подаючи стиснене повітря від ДР 1.2.8, яке створює надлишковий тиск. Значення тиску контролюють по манометру, якщо тиск падає це означає що обладнання має дефекти. Апарат з прилеглими трубопроводами перед загрузкою середовища перевіряють на герметичність під дією повітряного тиску 0,2 МПа, впродовж 30 хв. Нещільність в фланцевих з'єднаннях, зварювальних швах знаходяться за допомогою мильної води. Знайдені пропуски усувають і проводять повторну перевірку. Після перевірки відправляється на знешкодження до ЗВ 15.3.

ДР 2.4.5. Стерилізація ємнісного обладнання та комунікацій

При стерилізації ємнісного обладнання спочатку відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через барботер або нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації $T_{ст} = 130-135\text{ }^{\circ}\text{C}$ закривають усю запірну арматуру на апараті, крім парової, і витримують не менше 1,5–2 год. при тиску 0,3 МПа. При стерилізації апарата паралельно стерилізуються індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря.

ДР 3. Підготовка піногасника

ДР 3.1. Приготування та стерилізація піногасника для посівного апарату

Як піногасник використовуємо 30% силіконово-водну емульсію.

Силіконову рідину готують в кількості 0,2 % від об'єму культуральної рідини для посівного апарату:

$$0,002 \times 13,13 = 0,026 \text{ л.}$$

У колбу на 100 мл вносять 7,8 мл силікону та додають 18,2 мл нагріту до 60°C дистильовану воду. Після перемішування протягом 15-20 хв для гомогенізації, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C, 0,15 МПа протягом 50 хв.

Простерилізований піногасник подається до стадії *ТП 7.5*.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація піногасника для ферментеру

Як піногасник використовуємо 30% силіконово-водну емульсію.

Силіконову рідину готують в кількості 0,2 % від об'єму культуральної рідини для ферментера:

$$0,002 \times 129 = 0,258 \text{ л.}$$

У колбу на 1 л вносять 77,4 мл силікону та додають 180,6 мл нагріту до 60°C дистильовану воду. Після перемішування протягом 15-20 хв для гомогенізації, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C, 0,15 МПа протягом 50 хв.

Простерилізований піногасник подається до стадії *ТП 8.1*.

ДР 4. Підготовка титрувальних агентів

ДР 4.1. Приготування титрувального агенту 6% HCl

ДР 4.1.1. Приготування титрувального агенту 6% HCl для посівного апарату

Для створення рН розчину солей в межах 4,0-4,5 перед стерилізацією, у посівний апарат додають 6% HCl з розрахунком в кількості 0,2 % від об'єму культуральної рідини.

Розчин соляної кислоти додають при приготуванні поживного середовища для посівного апарату з об'ємом ПС 13,13 л. Розраховуємо потрібну кількість HCl:

$$0,2\% \times 13,13 \text{ л} = 0,026 \text{ л}$$

Під витяжною шафою у колбу об'ємом 100 мл вносять 20 мл дистильованої води. Потім за допомогою піпетки при постійному перемішуванні додають 6 мл 36% розчину HCl. Обов'язково рідини змішують у такому порядку, а не навпаки (для уникнення сильної екзотермічної реакції). Після змішування колбу закривають скляною пробкою.

Приготовлений розчин до ДР 5.2.2.

ДР 4.1.2. Приготування титрувального агенту 6% HCl для ферментера

Для створення рН розчину солей в межах 4,0-4,5 перед стерилізацією, у ферментер додають 6% HCl з розрахунком в кількості 0,2 % від об'єму культуральної рідини.

Розчин соляної кислоти додають при приготуванні поживного середовища для ферментеру з об'ємом ПС 129 л. Розраховуємо потрібну кількість HCl:

$$0,2\% \times 129 \text{ л} = 0,258 \text{ л}$$

Під витяжною шафою у колбу об'ємом 1 л вносять 200 мл дистильованої води. Потім за допомогою піпетки при постійному перемішуванні додають 60 мл 36% розчину HCl. Обов'язково рідини змішують у такому порядку, а не навпаки (для уникнення сильної екзотермічної реакції). Після змішування колбу закривають скляною пробкою.

Приготовлений розчин до ДР 5.3.2.

***ДР 4.2. Приготування та стерилізація титрувального агенту
6% NaOH***

*ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація титрувального агенту 6% NaOH
для посівного апарату*

Для доведення рН середовища до оптимального, після стерилізації при рН 4,0-4,5, додають 6% NaOH (контроль рН) з розрахунком в кількості 0,2 % від об'єму культуральної рідини. Розчин лугу додають в охолоджене поживне середовище в посівний апарат з робочим об'ємом 13,13 л.

Розраховуємо потрібну кількість 6% NaOH:

$$0,2\% \times 13,13 = 0,026 \text{ л}$$

На технічних вагах зважують 1,6 г NaOH і вносять у колбу об'ємом 100 мл, доливають 24,4 мл дистильованої води. Після змішування колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131⁰С, 0,15 МПа упродовж 50 хв.

Простерилізований розчин до ТП 7.5.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація титрувального агенту 6% NaOH для ферментера

Для доведення рН середовища до оптимального, після стерилізації при рН 4,0-4,5, додають 6% NaOH (контроль рН) з розрахунком в кількості 0,2 % від об'єму культуральної рідини. Розчин лугу додають в охолоджене поживне середовище в ферментер з робочим об'ємом 129 л.

Розраховуємо потрібну кількість 6% NaOH:

$$0,2\% \times 129 = 0,258 \text{ л}$$

На технічних вагах зважують 15,8 г NaOH і вносять у колбу об'ємом 1 л, доливають 242,2 мл дистильованої води. Після змішування колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131⁰С, 0,15 МПа упродовж 50 хв.

Простерилізований розчин до ТП 8.1.

ДР 5. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 5.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Для вирощування посівного матеріалу необхідно приготувати 1,19 л поживного середовища (10% від об'єму середовища). Джерелом вуглецю виступає глюкоза, джерелом азоту – кукурудзяний екстракт та нітрат натрію.

Вміст компонентів для приготування 1,19 л середовища наведений в *табл. 7.1.*

Враховуючи, що для засіву використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 120 мл (10% від загального об'єму середовища), загальну кількість води, яку необхідно додати для приготування поживного середовища становить 1135,5 мл.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1,19 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1 190 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм води, (мл)	Об'єм композиції, V, мл
глюкоза	20,0	23,8	А	883,3	925
кукурудзяний екстракт	15,0	17,9			
KH_2PO_4	6,0	7,2	Б	151,5	158,7
$NaNO_3$	1,0	1,2	В	101,0	105,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3,0	3,6			
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,002	0,003			
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,001	0,001			
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01	0,01			
			Всього:	1135,5	1 190,00

ДР 5.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 23,8 г глюкози і 17,9 г кукурудзяного екстракту. Наважку переносять у колбу об'ємом 2 л, додають 883,3 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, 0,05 МПа, протягом 30 хв. Після стерилізації проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

Розчин А: 883,3 мл води + 23,8 г глюкози + 17,9 г кукурудзяного екстракту = 925 мл

Простерилізована композиція до ТП 7.4., тара до ЗВ 15.2.

ДР 5.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують KH_2PO_4 , 7,2 г. Наважку поміщають у колбу об'ємом 500 мл, додають 151,5 мл дистильованої води, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131°С, 0,15МПа, 50 хв. Після стерилізації проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

Розчин Б: 151,5 мл води + 7,2 г KH_2PO_4 = 158,7 мл

Простерилізована композиція до ТП 7.4., тара до ЗВ 15.2.

ДР 5.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують усі солі: NaNO_3 , 1,2 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,6 г; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,003 г; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001 г; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 г. Наважку поміщають у колбу об'ємом 500 мл, додають 101,0 мл питної води. Отриманий розчин доводять до рН 5.5, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131°C, 0,15МПа, 50 хв.

Після стерилізації проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

Розчин А: 101,0 мл води + 1,2 г NaNO_3 + 3,6 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,003 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0,001 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,01 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 105,8 мл

Простерилізована композиція до ТП 7.4., тара до ЗВ 15.2.

ДР 5.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті

Як посівний апарат використовують ферментер з об'ємом 25 л (ФР-16).

Враховуючи, що для засіву посівного апарату використовується рідкий посівний матеріал, об'єм якого складає 1,31 л, то загальна кількість води, яку необхідно додати для приготування 13,13 л поживного середовища становить 11,22 л. Для приготування поживного середовища використовуємо питну воду, так як у середовищі немає кальцію, джерелом якого є саме така вода.

Вміст компонентів для приготування 13,13 л середовища наведено в табл. 7.2.

Таблиця 7.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 13,13 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 13,13 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм води, (л)	Конденсат (л)	Об'єм композиції, V, л
глюкоза	20,0	0,263	А	8,74	1,31	10,22
кукурудзяний екстракт	15,0	0,197				
NaNO_3	6,0	0,013	Б	2,49	-	2,91

KH_2PO_4	1,0	0,078				
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3,0	0,039				
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,002	0,000026				
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,001	0,000013				
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01	0,00013				
			Всього:	11,22	13,13	

ДР 5.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах у відтарованому мірному стакані об'ємом 500 мл зважують 263 г глюкози і 197 г кукурудзяного екстракту, після кожного зважування стакан з наважками відтаровують. Наважку переносять у реактор - змішувач (РЗ-14) об'ємом 20 л, додають 8,74 л питної води, перемішують, закривають і стерилізують в при температурі 112 °С, 0,05 МПа, протягом 30 хв.

Після стерилізації проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти. Потім композицію А самоплином подають у ФР-16.

Розчин А: 8740 мл води + 263 г глюкози + 197 г кукурудзяного екстракту + 1,02 = 9 200 мл = 9,2 л.

Простерилізована композиція до ТП 7.5., тара до ЗВ 15.2.

ДР 5.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують усі солі: KH_2PO_4 , 78 г; $NaNO_3$, 13 г; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 39 г; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,026 г; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,013 г; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,13 г. Наважку поміщають у колбу об'ємом 5 л, додають 2,49 л питної води, перемішують.

Отриманий розчин підкислюють до рН 4 - 4.5 розчином соляної кислоти (від ДР 4.1.1) (для унеможливлення утворення осадів). Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 131°C, 0,15 МПа, 50 хв. Після стерилізації проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти. Потім поживне середовище переносять у посівний апарат (ФР-16).

Розчин А: 2 490 мл води + 78 г KH_2PO_4 + 13 г $NaNO_3$ + 39 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + 0,026 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ + 0,013 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ + 0,13 г $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ = 2 620 мл = 2, 62 л.

Простерилізована композиція до ТП 7.5., тара до ЗВ 15.2.

ДР 5.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

Для культивування дріжджів у ферментері (ФР-23) об'ємом 250 л необхідно приготувати 129 л поживного середовища.

Враховуючи, що для засіву ферментера використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 13,13 л та кількість конденсату, утвореного під час стерилізації поживного середовища в ферментаторі (10%). Отже, загальну кількість води, яку необхідно додати для приготування 129 л поживного середовища становить 103,73 л.

Для приготування поживного середовища використовуємо питну воду, так як у середовищі немає кальцію, джерелом якого є саме така вода.

Вміст компонентів для приготування 129 л середовища наведено в табл. 7.3.

Таблиця 7.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 129 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 129 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм води, (л)	Конденсат (л)	Об'єм композиції, V, л
глюкоза	20,0	2,58	А	80,69	19,35	85,2
кукурудзяний екстракт	15,0	1,93				
$NaNO_3$	6,0	0,13	Б	23,04		24,33
KH_2PO_4	1,0	0,77				
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3,0	0,39				
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,002	0,00026				
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,001	0,00013				
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01	0,0013				
			Всього:	103,73		129

ДР 5.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через ваговий дозатор (Д-17) у реактор-змішувач (РЗ-18) об'ємом 100 л вносять 2 580 г глюкози і 1 930 г кукурудзяного екстракту, після чого додають 80,69 л питної води, вмикають мішалку та перемішують.

Стерилізують композицію А з помірним перемішуванням, подаванням спочатку глухої пари у сорочку, а потім гострої у реактор – змішувач (РЗ-18). Стерилізацію проводять при температурі 112 °С, 0,05 МПа, протягом 30 хв. Після стерилізації проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти. Потім середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку ферментера при перемішуванні та за допомогою перистальтичного насоса (Н-19) перекачують у ферментер (ФР-23).

Розчин А: 80 690 мл води + 2 580 г глюкози + 1 930 г кукурудзяного екстракту = 85 200 мл = 85,2 л

Простерилізована композиція до ТП 8.1., тара до ЗВ 15.2.

ДР 5.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують усі солі: 770 г KH_2PO_4 , 130 г $NaNO_3$, 390 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,26 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,13 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,3 г $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Наважку поміщають у збірник (З-20) об'ємом 40 л, додають 223,04 л питної води, вмикають мішалку та перемішують.

Отриманий розчин підкислюють до рН 4 - 4.5 розчином соляної кислоти (від ДР 4.1.2) (для унеможливлення утворення осадів).

Солі композиції Б змішуються у збірнику на 40 л (З-20), після чого вони за допомогою відцентрового насоса (Н-11) поступають в ферментер об'ємом 250 л (ФР-23). Стерилізують солі помірним перемішуванням, подаванням спочатку глухої пари у сорочку, а потім гострої у ферментері. Стерилізацію проводять при температурі 131 °С, 0,15 МПа, протягом 50 хв. Після стерилізації проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти. Потім середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку ферментера при перемішуванні.

Розчин Б: 23 040 мл води + 770 г KH_2PO_4 + 130 г $NaNO_3$ + 390 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + 0,26 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ + 0,13 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ + 1,3 г $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ = 24 330 мл = 24, 33 л.

Простерилізована композиція до ТП 8.1., тара до ЗВ 15.2.

ДР 6. Підготовка захисного середовища

ДР 6.1. Підготовка захисного середовища

Для ліофільного висушування дріжджів їх біомасу необхідно змішати з захисним середовищем. Для його приготування на технічних вагах зважують 299г желатози та 299г сахарози. Наважку переносять у колбу об'ємом 5 л, додають 2 л води очищеної ($t = 35-40^\circ C$), ретельно перемішують.

Окремо готується агар. На технічних вагах зважують 0,6 г агару, наважку переносять у колбу об'ємом 1 л, додають 400 мл води очищеної $t=40^\circ C$, перемішують та залишають для набухання. Після набухання розчин доливають до сахарози і желатози. Далі перемішують для отримання однорідної маси.

Після перемішування колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі $112^\circ C$, 0,05 МПА, протягом 30 хв.

Після стерилізації середовище охолоджують до $t= 35-40^\circ C$ з підтриманням сталої температури, до моменту змішування з біомасою. Також проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

Простерилізована композиція до ТП 10.1.

ТП 7. Підготовка посівного матеріалу

ТП 7.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 зберігають у флаконах у ліофілізованому вигляді при $-80^\circ C$. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводяться в строго асептичних умовах [7, 26].

ТП 7.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796, що зберігалася у флаконах, розсівають методом виснажуючого штриха на YPD агар

у чашках Петрі для одержання ізолюваних колоній та вирощують впродовж 24 годин, при температур 37 °С [26].

ТП 7.3. Вирощування інокуляту на агаризованому середовищі

Отримані ізолювані колонії з чашки Петрі (від ТП 7.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним YPD (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Культивують в термостаті при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (24 год). Мікробіологічний контроль культури (кожні 5-6 год) здійснюють мікроскопіюванням [7].

ТП 7.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 2 л до 925 мл розчину композиції А (від ДР 5.1.1), в асептичних умовах вносять 159 мл розчину композиції Б (від ДР 5.1.2) та 106 мл розчину композиції В (від ДР 5.1.3), перемішують та охолоджують.

Потім середовище розливають по 150 мл у 9 стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *S. boulardii* ATCC-MYA-796, вирощену на середовищі YPD, вносять до 1 мл фізіологічного розчину хлориду натрію, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану дріжджову суспензію і вносять у колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують дріжджову суспензію, одержану з однієї пробірки.

Після вирощування дріжджів у колбах на качалці (200 об/хв) упродовж 24 год, культуральну рідину з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 2л.

Мікробіологічний контроль культури здійснюють мікроскопіюванням, а також висівом на агаризоване середовище YPD.

Якщо сторонньої мікрофлори немає, то культуру вносять в стерильну засівну колбу об'ємом 2 л та використовують як посівний матеріал для вирощування культури в посівному апараті.

ТП 7.5. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті

Вирощування рідкого посівного матеріалу у посівному апараті об'ємом 25 л (ФР-16).

У попередньо простерилізований посівний апарат в асептичних умовах самоплином вносять до 10,22 л розчину композиції А (від ДР 5.2.1), та подають 2,91 л розчину композиції Б (від ДР 5.2.2) з колб, перемішують та охолоджують.

Кисле середовище доводять до рН 5,5 стерильним розчином лугу (від ДР 4.2.1) за показами датчика рН.

Далі вносять посівний матеріал (від ТП 7.4). Для цього в асептичних умовах інокулят з засівної колби переносять у посівний апарат, включають перемішуючий пристрій та подають стиснене аераційне повітря (від ДР 1.2.8), в сорочку ферментера подають оборотну воду.

Для гасіння піни, що утворюється в процесі культивування використовують стерильний піногасник (від ДР 3.1).

Культивування здійснюють при температурі 37 °С, 200 об/хв впродовж 16 год. Перед внесенням інокуляту в посівний апарат перевіряють рН 5,5.

Через кожні 3-4 год здійснюють мікробіологічний контроль як описано вище, а також визначають концентрацію біомаси, яка має бути не нижче ніж 4,1 г/л.

Відпрацьоване повітря до ЗВ 15.3.

ТП 8. Біосинтез

ТП 8.1. Виробниче культивування

Виробниче культивування здійснюють у ферментері об'ємом 250 л (ФР-23). До 24,33 л розчину композиції Б (від ДР 5.3.2), в асептичних умовах за допомогою перистальтичного насосу (Н-19) вносять 85,2 л розчину композиції А (від ДР 5.3.1), перемішують та охолоджують.

Перед додаванням посівного матеріалу (від ТП 7.5) приготовлене поживне середовище доводять до рН 5,5 стерильним розчином лугу (від ДР 4.2.2) за показами датчика рН.

Далі через трубу перетискування перекачують з посівного апарату інокулят (від *ТП 7.5*). Вмикають перемішування та подають стиснене аераційне повітря (від *ДР 1.2.8*), в сорочку ферментера подають оборотну воду.

Для гасіння піни, що утворюється в процесі культивування використовують стерильний піногасник (від *ДР 3.2*).

Вирощують культуру при температурі 37°C з частотою обертів перемішуючого пристрою 400 об/хв і постійною аерацією впродовж 16 год.

Культивування проводять до рівня концентрації біомаси 8,2 г/л [26].

У процесі культивування проводиться відбирання проби для мікробіологічного контролю з періодичністю в 3-4 год.

Після біосинтезу біомасу відділяють від культуральної рідини центрифугуванням (до *ТП 9.1*).

Відпрацьоване повітря до *ЗВ 15.3*.

ТП 9. Відділення біомаси

ТП 9.1. Центрифугування культуральної рідини

Після виробничого культивування, культуральна рідина із ферментера перистальтичним насосом (Н-24) подається до збірника (З-25), а потім за допомогою перистальтичного насосу (Н-26) передається до відстійної центрифуги (Ц-27) з метою розділення.

Під час центрифугування контролюється швидкість 5000 об/хв (впродовж 15 хв). Біомаса, що відділяється під час центрифугування надходить у реактор-змішувач (РЗ-28) (до *ТП 10.1*).

Супернатант до *ЗВ 15.1*.

ТП 10. Отримання напівфабрикату

ТП 10.1. Змішування біомаси з захисним середовищем

Біомаса, масою 9,975 кг, після центрифугування надходить у реактор-змішувач (РЗ-28), туди в асептичних умовах подається простерилізоване захисне середовище з колб (від *ДР 6.1*). Біомаса з захисним середовищем перемішується впродовж 20 хв при 40 об/хв. Далі біомасу подаються на стадію ліофільного висушування (до *ТП 11.1*).

ТП 11 Отримання сухої біомаси

ТП 11.1. Ліофільне висушування біомаси

Отриману біомасу з захисним середовищем масою 12,965 кг (від ТП 10.1) подають на полиці сушарки (С-29) і піддають ліофільному висушуванню.

Етап сушіння препарату складається з двох стадій. Спочатку відбувається заморожування в камері субліматора при $t = -60^{\circ}\text{C}$ упродовж 24 год. Зниження температури відбувається в $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.

Наступним етапом є висушування біомаси. Перед початком процесу сушіння вмикається вакуумний насос та відкривається головна засувка установки і тоді починається процес сушіння. На початку процесу створюється глибокий вакуум - 26,6 Па.

Система циркуляції теплоносія вмикається через пів години після початку процесу. Температура теплоносія змінюється за рахунок природної циркуляції.

Після години роботи сушарки датчик температури встановлюють на 25°C . Повільний нагрів теплоносія на $1-2^{\circ}\text{C}$ в год починають через 30 год після початку процесу сушіння і продовжують підігрів до температури теплоносія, що має становити $32-34^{\circ}\text{C}$.

Паралельно з підвищенням температури теплоносія також підвищується температура препарату на $1-2^{\circ}\text{C}$ за год. Коли температура цільового продукту досягне $32-34^{\circ}\text{C}$ його витримують впродовж 6 годин. При закінченні процесу вакуум становить 5,3 Па. Процес ліофільного висушування триває - 55-60 год.

По закінченню процесу, коли тиск у камері повернеться до норми, вона заповнюється азотом.

З ліофілізатора отриманий висушений продукт вивантажується, накривається безворсовими сарфетками і подається на стадію подрібнення (до ТП 12.1).

ТП 12. Подрібнення ліофільно висушеної біомаси

ТП 12.1. Подрібнення біомаси молотковою дробаркою

Після ліофільного висушування біомаса (від ТП 11.1) у вигляді твердого суцільного коржа надходить на стадію подрібнення. Також надходить погано

подрібнена біомаса від ТП 13.1. Подрібнення здійснюється на молотковій дробарці (М-30) до розміру часток 0,16 мм. Після подрібнення вивантажується, накривається безворсовими сарфетками і подається на стадію просіювання (до ТП 13.1).

ТП 13. Просіювання подрібненої біомаси

ТП 13.1. Просіювання біомаси на вібраційному ситі

Просіювання подрібненої біомаси (від ТП 12.1) здійснюється на віброситі (В-31) до отримання однорідних часточок (0,16 мм). Після просіювання біомаса, яка залишилася на ситі знову повертається на стадію ТП 12.1 для повторного подрібнення. Процес повторюють декілька разів.

Отриманий просіяний продукт накривається безворсовими сарфетками передається на стадію пакування та маркування (до ТП 14.1).

Пилеподібні викиди до ЗВ 15.3.

ПМВ 14. Пакування, маркування та відвантаження

ПМВ 14.1. Фасування та первинна упаковка ліофільно висушеної біомаси у пакетики саше

Фасування та первинна упаковка здійснюється у фасувально - пакувальному автоматі (АВ-32). Просієний порошок (від ТП 13.1) для орального застосування фасується по 250 мг та упаковується у багатошарові пакетики саше, запаюється швом, відрізається та подається на вторинну упаковку до ПМВ 14.2.

ПМВ 14.2. Вторинна упаковка пакетиків саше у пачки

Після фасування саше надходить на вторинну упаковку у пачки (АВ-33). Конвеєр подачі продукту переміщує 10 складених пакетів в механізм упаковки. Картонна пачка прямує вниз за допомогою вакууму і формується механічно. Вироби групами подаються всередину картону за допомогою пневматичного циліндра, а також туди надходить складена інструкція. Машина по напрямних закриває клапани картонній пачки і переміщує готовий продукт на вихід для упаковки в гофрокороб (до ПМВ 14.3).

ПМВ 14.3. Упаковка пачок у гофрокороб та відвантаження

Упаковка пачок з саше (від ПМВ 14.2) в ящик з гофрованого картону (315×225×115) мм здійснюється вручну. Пачки по 50 штук складають в групову тару та відправляють на склад для зберігання. Зберігають в захищеному від сонця і вологі місці при температурі не вище 25°C.

ЗВ 15 Знешкодження відходів

ЗВ 15.1 Знешкодження рідких відходів

Очищення рідких відходів: супернатант від ТП 9.1, а також відпрацьовані розчини миючих та дезінфікуючих речовин від ДР 2.3.1, ДР 2.3.2, ДР 2.4.1, ДР 2.4.2) відбувається в мембранному біореакторі (МБР). В основу роботи МБР покладено сукупне використання біотехнологічного синтезу (очищення з використанням активного мулу) і технології поділу водних суспензій на ультрафільтраційних полімерних мембранах.

ЗВ 15.2 Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи представлені тарою з-під миючо-дезінфікуючих засобів від ДР 2.1.1, ДР 2.1.2, ДР 2.1.3.1, ДР 2.1.3.2 та від приготування поживного середовища від ДР 5.1.1, ДР 5.1.2, ДР 5.1.3, ДР 5.2.1, ДР 5.2.2, ДР 5.3.1, ДР 5.3.2 піддаються багатоетапній переробці.

ЗВ 15.2 Знешкодження газоподібних відходів

Очищення викидів від газоподібних (діоксид вуглецю, який утворюється під час культивування дріжджів від ТП 7.5 та ТП 8.1), пилоподібних домішок (процес подрібнення від ТП 13.1) та відпрацьованого повітря (процес перевірки обладнання на герметичність від ДР 2.4.4.) здійснюють у пінних абсорберах.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Таблиця 8.1

Карта контрольних точок накопичення біомаси пробіотичних дріжджів *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативні значення показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт 1.2.2. Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E=80% Тиск згідно паспорту
Кт 1.2.3. Стиснення (компресування) повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	t=200°C, P=0,9МПа
Кт 1.2.4. Охолодження стиснутого повітря	Охолоджене повітря, температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	T = 25 – 40 °C
Кт 1.2.5. Видалення вологи	Повітря після видалення зайвої вологи, вміст вологи	Психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	W = 60 - 70 %
Кт 1.2.6. Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	T = 45 - 50 °C W = 50 %
Кт. 1.2.7. Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в головному фільтрі	E=95%

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва			
Розроб.	Зомчак В.В.							
Перевір.	Грегорчак Н.М.							
Консультант								
Н.Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.				Літ. Арк. Актуалізовано 101 142 Кафедра БТМ¹⁰³			

<i>Кт.1.2.8. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E=99,995%
<i>К_т, К_м 3.1 Приготування та стерилізація піногасника для посівного апарата</i>	Піногасник 30% силіконово- водна емульсія Температура, тиск, час, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологі чний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °C, τ = 40 хв, Відсутність мікробіоти
<i>К_т, К_м 3.2 Приготування та стерилізація піногасника для ферментера</i>	Піногасник 30% силіконово- водна емульсія Температура, тиск час, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологі чний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °C, τ = 50 хв, Відсутність мікробіоти
<i>К_х 4.1.1 Приготування титрувального агенту 6% HCl для посівного апарата</i>	Розчин соляної кислоти Концентрація	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 6%
<i>К_х 4.1.2 Приготування титрувального агенту 6% HCl для ферментера</i>	Розчин соляної кислоти Концентрація	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 6%
<i>К_т, К_х, К_м 4.2.1. Приготування та стерилізація титрувального агенту 6% NaOH для посівного апарата</i>	Розчин гідроксиду натрію Тиск, температура, час, концентрація, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, хімічний метод мікробіологі чний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, концентрація та мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °C, τ = 50 хв, C = 6%, Відсутність мікробіоти
<i>К_т, К_х, К_м 4.2.2. Приготування та стерилізація титрувального агенту 6% NaOH для ферментера</i>	Розчин гідроксиду натрію Тиск, температура, час, концентрація, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, хімічний метод мікробіологі чний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, концентрація та мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °C, τ = 50 хв, C = 6%, Відсутність мікробіоти

К _Т , К _М 5.1.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирошування посівного матеріалу в колбах на качалках Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,05 МПа, τ = 30 хв, Відсутність мікробіот и
К _Т , К _М 5.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,15 МПа, τ = 50 хв, Відсутність мікробіот и
К _Т , К _М 5.1.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,15 МПа, τ = 50 хв, Відсутність мікробіот и
К _Т , К _М , 5.2.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирошування посівного матеріалу в посівному апараті Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,05 МПа, τ = 30 хв, Відсутність мікробіот и
К _Т , К _М , К _х 5.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Тиск, температура, час, рН стерильність	Манометр, годинник, рН -метр, мікробіологічний контроль	Тиск, рН визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,15 МПа, τ = 50 хв, рН 4,0-4,5 Відсутність мікробіот и

К _Т , К _М 5.3.1 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в ферментері</i> <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,05 МПа, τ = 30 хв, Відсутність мікробіоти
К _Т , К _М , К _Х 5.3.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, температура, час, рН стерильність	Манометр, годинник, рН -метр, мікробіологічний контроль	Тиск, рН визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,15 МПа, τ = 50 хв, рН 4,0-4,5 Відсутність мікробіоти
К _Т , К _М 7.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>Saccharomyces boulardii</i> ATCC-MYA-796 Температура, відсутність сторонньої мікробіоти	Датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура, мікробіологічний контроль проводять кожні 3-4 міс	t = -80 °С, τ = 3-4 місяці, Відсутність сторонньої мікробіоти
К _Т , К _М 7.2 <i>Одержання робочої культури на агаризованих середовищах</i>	Колекційна культура <i>Saccharomyces boulardii</i> ATCC-MYA-796 Температура, час вирощування Відсутність сторонньої мікробіоти	Годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час вирощування в термостаті, мікробіологічний контроль проводять кожні 3-4 год	t = 30 °С, τ = 48 год, Відсутність сторонньої мікробіоти
К _Т , К _М 7.3. <i>Вирощування інокуляту на агаризованих середовищах</i>	Колекційна культура <i>Saccharomyces boulardii</i> ATCC-MYA-796 Тривалість культивування, температура, морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти	Годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час вирощування культури в термостаті, мікробіологічний контроль проводять кожні 3-4 год	t = 30 °С, τ = 48 год, Відсутність сторонньої мікробіоти

K_T, K_X, K_M 7.4. Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал Тривалість культивування, температура, частота обертів качалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Спектрофотометр, годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	pH визначається перед культивуванням, температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання та висів на аризоване середовище – кожні 3-4 год	pH=5,5 $\omega = 200$ об/хв $t = 37^\circ\text{C}$ $\tau = 24$ год $X = 4,1$ г/л Відсутність сторонньої мікробіоти
K_T, K_X, K_M 7.5 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 25 л	Посівний матеріал Тривалість культивування, рівень pH, рівень піни, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація біомаси, витрати повітря	Спектрофотометр, годинник, датчик pH, датчик піноутворення, датчик температури, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	pH визначається перед культивуванням, температура, рівень піни і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси відбираються кожні 3-4 год	pH=5,5 $\omega = 200$ об/хв $t = 37^\circ\text{C}$ $\tau = 16$ год Відсутність сторонньої мікробіоти $X=4,1$ г/л
K_T, K_X, K_M 8.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 250л	Культуральна рідина Тривалість культивування, рівень pH, піни, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація біомаси	Спектрофотометр, годинник, датчик pH, датчик піноутворення, датчик температури, годинник, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	pH визначається перед культивуванням, температура, рівень піни та швидкість обертів мішалки – контролюються і підтримуються автоматично весь час, проби відбираються кожні 3-4 год	pH=5,5 $\omega = 400$ об/хв $t = 37^\circ\text{C}$ $\tau = 16$ год Відсутність сторонньої мікробіоти $X=8,2$ г/л

8.2. Мікробіологічний контроль

Зважаючи на те, що культивування дріжджів *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 з метою накопичення біомаси проводиться в асептичних умовах, необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах, для того щоб впевнитись у відсутності контамінації.

Кожні 3 год з посівного апарата і ферментера відбирають зразки культуральної рідини для аналізу.

Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища.

Пробу простерилізованого поживного середовища відбирають в об'ємі, як правило, 50 мл і здійснюють прямим висівом на агаризовані середовища. Контроль здійснюють шляхом розсівання проби простерилізованого поживного середовища (або стерильної композиції поживного середовища перед змішуванням) на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем і подальшим інкубуванням [149].

Мікробіологічний контроль здійснюється двома шляхами: прямий висів на агаризовані поживні середовища і мікроскопіювання.

Прямий висів здійснюється посівом культуральної рідини до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо–пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, та глюкозо–картопляним агаром (ГКА) або сусло–агаром (СА) – грибів та дріжджів [149].

Визначення життєздатності клітин мікроорганізмів

Життєздатність клітин *S. boulardii* визначали «чашковим» методом Коха за кількістю макроколоній, які сформувалися окремими клітинами на поверхні агаризованих середовищ після висіву на них суспензій мікробних клітин із різних розведень [150, 151].

Дріжджі *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 на агаризованому середовищі YPD мають такий вигляд (рис. 8.1).

Морфологічно *S. boulardii* - скупчення круглою формою, білувато-кремового кольору, еліптичної морфології та утворені псевдо гіфи; колонії є грубі та розпорошені [152].



Рис. 8.1. Морфологічні особливості колоній *S. boulardii* ATCC-MYA-796 на агаровому середовищі YPD [152]

Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі. Для мікроскопіювання використовують препарати «роздавлена крапля».

За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти під час мікроскопіювання можна побачити клітини *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 (рис. 8.2).

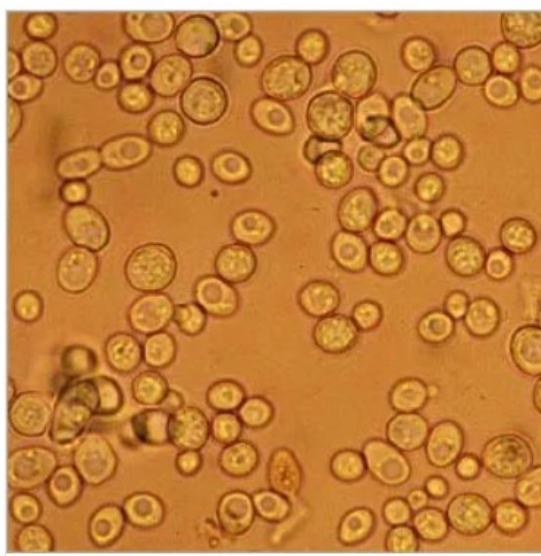


Рис. 8.2. *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 у полі мікроскопа ($\times 40$) [153].

Клітини *Saccharomyces boulardii* зазвичай мають розміри $5^{-10} \times 5^{-13}$ мкм, круглу чи овальну форму, розмножуються брунькуванням, добре забарвлюються аніліновим барвником [7].

8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.3.1. Концентрація біомаси

Для визначення концентрації біомаси *Saccharomyces boulardii* у пробірку наливають 9 мл стерильної води та вносять 1 мл культуральної рідини. Суспензію перемішують і вимірюють оптичну щільність при OD_{600} за допомогою спектрофотометра у кюветах з довжиною оптичного шляху $l = 1$ см. Як контроль використовують кювету з стерильною водою. Потім біомасу дріжджів розраховують на основі попередньо підготовленої стандартної кривої (калібрувальний графік), в якій одна одиниця OD_{600} дорівнює 0,33 г/л [26, 154].

Обладнання для проведення аналізу.

Зміну приросту біомаси визначали за значенням оптичної густини суспензії, яку вимірювали за допомогою спектрофотометра DR 6000 (виробник - Китай) при довжині хвилі 600 нм. Для дослідження використовували скляні кювети з довжиною оптичного шляху $l = 1$ см. За калібрувальним графіком знаходили кількість клітин та приріст біомаси (рис. 8.3).



Рис. 8.3 Спектрофотометр DR 6000 УФ і видимого діапазону [154].

8.3.2. Концентрація джерела Карбону та Нітрогену

Визначення концентрації джерела Карбону

Для культивування *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 використовується поживне середовище, джерелом вуглецю в якому є глюкоза. Вміст джерела Карбону за концентрацією редукуючих речовин визначають методом Бертрана.

Концентрацію джерела вуглецю визначають у супернатанті, який утворюється після осадження біомаси продуцента. Для цього у центрифужну

пробірку відбирають 1-3 мл культуральної рідини, центрифугують при таких параметрах: 5000 об/хв протягом 15 хв [26].

За об'ємом марганцевокислого калію, що пішов на титрування розчину сульфату заліза (II), визначають кількість міді, що відновлена при окислюванні цукру, а потім по спеціальних таблицях знаходять кількість цукру [155].

Визначення концентрації джерела Нітрогену

Для культивування *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 використовується поживне середовище, джерелом азоту в якому є нітрат натрію та кукурудзяний екстракт.

Пробопідготовку здійснюють так, як і для визначення концентрації джерела вуглецю.

Визначення концентрації нітрату натрію.

У колбу Ерленмейєра об'ємом 50 мл вносять 0,2 мл дослідного розчину поживного середовища і 0,8 мл 5% розчину саліцилової кислоти, що готується заздалегідь на основі концентрованої сірчаної кислоти.

Через 20 хв при кімнатній температурі краплинами додають 19 мл 2 н NaOH. Вміст колби при цьому постійно перемішують. Через 1-2 хв з'являється стійке (протягом 48 год) жовте забарвлення. Розчин колориметрують на ФЕК при довжині хвилі 410 нм.

В якості контролю використовують розчин, приготовлений так, як і досліджуваний, за винятком того, що у контроль додають 0,2 мл дистильованої води замість супернатанту.

Вміст нітратів визначають за допомогою калібрувальної шкали, яку будують заздалегідь, використовуючи KNO_3 . Цей реактив є гігроскопічним, тому, перш за все його висушують у термостаті до сталої ваги. Для побудови калібрувального графіку готують ряд розчинів різної концентрації KNO_3 у межах 5 мкг/мл – 55 мкг/мл, об'ємом 0,2 мл.

На калібрувальному графіку позначають: по осі ординат – оптичну густину кожного розчину, а по осі абсцис – концентрацію азоту. Вимірявши

оптичну густину досліджуваного зразка визначають концентрацію азоту за цим графіком [156].

Визначення концентрації амінного азоту у кукурудзяному екстракті.

Визначення амінного азоту формольним титруванням (алкаліметрія за методом Серенсена) [37]. Метод засновано на блокуванні формальдегідом при рН=7,0 вільних аміногруп і титруванні лугом еквівалентної кількості карбоксильних груп. Початок і кінець титрування визначають потенціометрично. В стакан об'ємом 50 мл наливають 2 мл дослідного розчину поживного середовища і доводять об'єм водою очищеною до 20 мл. Коригують рН потенціометрично до значення 7,0 за допомогою розчину NaOH 0,1М або HCl 0,1М. До нейтрального розчину додають 2,0 мл нейтрального формаліну (рН доводять до 7,0 10 %-им розчином NaOH), перемішують і титрують потенціометрично до рН 9,1 за допомогою розчину NaOH 0,1М.

Вміст амінного азоту у зразку (в мг%) визначають за формулою:

$$X = V \cdot K \cdot 1.4 \cdot 100 / 2 \text{ де,}$$

V – кількість розчину NaOH 0,1М в мл, що пішла на титрування проби;

K – поправка до титру розчину NaOH 0,1М, що використовувався;

1.4 – кількість амінного азоту в мг, еквівалентна 1 мл розчину NaOH 0,1М;

2 – об'єм зразка, мл.

8.4. Показники якості готового продукту

Методи контролю препарату пробіотика Ентерол проводяться згідно Аналітичної нормативної документації (АНД) [157].

8.4.1. Зовнішній вигляд препарату пробіотика Ентерол

Порошок світло-коричнюватого кольору з характерним фруктовим запахом. Визначають візуально

8.4.2. Автентичність препарату пробіотика Ентерол

Непатогенні дріжджі, що відносяться до аскоміцетів. Клітини *Saccharomyces boulardii* мають розміри 5-10 x 5-13 мкм, круглу або овальну форму, розмножуються брунькуванням, є факультативними анаеробами. При

рості на агаризованих сережовищах YPD дані дріжджі утворюють колонії круглої форми білувато-кремового кольору. Визначають бактеріоскопічно.

8.4.3. Фізико-біохімічні характеристики препарату пробіотика Ентерол

8.4.3.1. Розчинність препарату пробіотика Ентерол

При додаванні *води Р* із розрахунку 1 мл на 1 дозу препарату протягом 5 хвилин утвориться гомогенна суспензія світло-коричнюватого кольору. Визначають візуально.

8.4.3.2. Прозорість препарату пробіотика Ентерол

Суспензія має бути не прозорою. Приготування розчину проводять за п.3 АНД «Розчинність». Визначають візуально.

8.4.3.3. Кольоровість препарату пробіотика Ентерол

Суспензія повинна мати світло-коричнюватий колір. Приготування розчину проводять за п.3 АНД «Розчинність». Визначають візуально.

8.4.3.4. рН препарату пробіотика Ентерол

Від 5.5 до 6.5. Суспензія готують за п.3 АНД «Розчинність». Визначають згідно ДФУ, вид.1, р.2.2.3., с.17, потенціометрично.

8.4.3.5. Втрати в масі при висушуванні препарату пробіотика Ентерол

Втрата не більше 3.5 %. Визначають згідно з ДФУ, вид.1, р.2.2.32, с. 49. 0,1г сухої розтертої біомаси із саше сушать у вакуум-сушильній шафі при температурі від 58 до 62°C і за тиску від 1,5 кПа до 2,5 кПа до постійної маси.

8.4.4. Специфічна нешкідливість препарату пробіотика Ентерол

Препарат має бути нешкідливим для білих мишей для введенні його перорального в кількості однієї дози. Випробування проводять на 5-ти безпородних мишах різної статі масою 14–16 г (зважування проводять безпосередньо перед дослідом).

Вміст саше розводять *водою Р* з розрахунку 0,5 мл на 1 дозу препарату. Кожній з 5-ти мишей вводять 0,5 мл отриманої зависі перорально в шлунок за допомогою насадки на шприц місткістю 1 мл. Термін спостереження – 5 діб.

Всі тварини повинні залишитися живими та не втратити у вазі. У випадку загибелі за цей період хоча б однієї тварини або втраті у вазі контроль повторюють на подвійній кількості тварин. Препарат вважають нешкідливим, якщо при повторному випробуванні не загинула жодна з мишей. У протилежному випадку дану серію препарату бракують.

8.4.5. Мікробіологічна чистота

Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, пліснявих та дріжджеподібних грибів. Визначають згідно з ДФУ, доп. 1, р. 2.6.12, с.37, р. 2.6.13, N, с. 42.

Зразок лікарського засобу у кількості 10 г поміщають у мірний флакон місткістю 250 мл, доводять до 100 мл (розведення 1:10) буферним розчином з натрієм хлоридом і пептоном, рН 7,0 та перемішують до отримання гомогенної зависі.

Для визначення загальної кількості бактерій по 1 мл зависі висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з густим поживним середовищем №1 методом двошарового висівання.

Для визначення загальної кількості грибів по 1 мл зависі висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з густим поживним середовищем 2 методом двошарового висівання.

Посіви на середовищі №1 інкубують при 30–35 °С для виявлення бактерій, а посіви з середовищем №2 – при 20–25 °С для виявлення грибів протягом 5 діб, якщо вірогідні результати не будуть отримані раніше.

Для визначення окремих видів мікроорганізмів по 10 мл зависі висівають на рідких поживних середовищах: №3 (для виявлення бактерій родини *Enterobacteriaceae*) та №8 (для виявлення *Pseudomonas aureginosa* та *Staphylococcus aureus*). Посіви інкубують при 30–35 °С протягом 18–24 год, після чого роблять пересіви з середовища №3 на густі середовища №4 та №5, а з середовища №8 – на середовища №9 та №10. Посіви інкубують при 35–37 °С протягом 24–48 год. При наявності росту мікроорганізмів проводять їх ідентифікацію згідно вимог ДФУ, доп. 1, р. 2.6.13, N, с.42.

Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, плісняви та дріжджеподібних грибів. У випадку виявлення в посівах сторонніх мікроорганізмів, контроль проводять на подвоєній кількості зразків препарату. При відсутності росту мікроорганізмів при повторному висіві досліджуваний препарат вважають таким, що відповідає вимогам. У випадку росту сторонніх мікроорганізмів при повторному висіві зразків серію препарату бракують.

8.4.6. Контроль кількості життєздатних клітин в одній дозі препарату

Визначення кількості живих сахароміцетів в одній дозі препарату проводять на трьох зразках препарату від кожної серії.

Вміст саше після розведень висівають по 0,1 мл мікробної суспензії на 4 чашки Петрі з середовищем YPD. Чашки інкубують 24 год при 37 °С, виконують підрахунок вирослих колоній і обчислюють вміст живих дріжджів в 1 дозі препарату. В одній дозі препарату (1 саше) при випуску повинне міститися не менш $5 \cdot 10^9$ живих сахароміцетів.

8.4.7. Специфічна активність

Антагоністична активність. Антимікробну дію досліджуваних пробіотичних культур визначають кількома методами, наприклад відстроченого антагонізму, різновидом якого є *метод агарових блоків*.

Розглянемо детальніше суть цього методу. Штами пробіотичних мікроорганізмів висівають на агаризоване середовище YPD.

Вирощування здійснюють в аеробних умовах за температури 37 °С упродовж 24 год, після чого агаровий блок вирізають пробійником та розміщують у центрі чашки Петрі з середовищем Гаузе-2 і радіально підсівають тест-культури. Засіяні чашки інкубують за температури 37 °С упродовж 24 год. Ступінь чутливості тест-культур оцінюють за розмірами зон затримки 30 — чутливі; 30-40 — високочутливі [30].

Стійкість до антибіотиків. Першим етапом визначення стійкості пробіотичних мікроорганізмів до дії антибіотиків різних груп є виконання посіву пробіотичної культури *S. boulardii* ATCC-MYA-796 на щільне поживне середовище YPD однорідним шаром. Визначення стійкості пробіотичних

мікроорганізмів до дії антибіотиків різних груп проводять методом *паперових дисків*, який полягає у дифузії в агар антибіотиків зі стандартних паперових дисків, які просочені певним дезрозчином в чітко визначеній концентрації. Такі диски встановлюються на щільне поживне середовище з попередньо засіяною культурою рівномірно на відстані від краю чашки Петрі близько 20 мм та на такій же відстані один від одного. В одній чашці можна встановлювати диски з різними препаратами або з різними концентраціями однієї досліджуваної речовини.

Для оцінки ступеня чутливості мікроорганізмів до антимікробних препаратів при виконанні дослідження будь-яким із наведених методів вимірюють зону затримки росту тестової культури. Відсутність зони затримки росту вказує на те, що досліджувана культура не чутлива до дії даного антимікробного засобу. При діаметрі зони до 15 мм вважають, що мікроорганізми мають малий ступінь чутливості до досліджуваного засобу, діаметр зони від 15 до 25 мм вказує на середній ступінь чутливості. Наявність зони діаметром більше 25 мм свідчить про високий ступінь чутливості мікроорганізмів до даного антимікробного засобу [30].

8.4.8. Термін придатності

Термін придатності - 3 роки. Зберігати в захищеному від сонця і вологи місці при температурі не вище 25 °C [157, 50].

РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

9.1 Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки з формуванням завдання на розробку системи автоматизації

Для автоматизації обираємо ділянку виробничого біосинтезу дріжджів *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 з метою одержання цільового продукту – пробіотичний препарат «Ентерол».

Поживне середовище для вирощування має наступний склад, г/л [26]:

- глюкоза, 20,0;
- кукурудзяний екстракт, 15,0;
- $NaNO_3$, 1,0;
- KH_2PO_4 , 6,0;
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3,0;
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,002;
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001;
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01.

Культивування *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 здійснюється глибинним та періодичним способом у промисловому ферментері серії BIORUS-SJA об'ємом 250 л з коефіцієнтом заповнення 0,6.

До попередньо простерелізованого розчину композиції Б (24,33 л), в асептичних умовах, за допомогою перистальтичного насосу вносять 85,2 л розчину композиції А, перемішують та охолоджують.

Перед додаванням посівного матеріалу приготовлене поживне середовище доводять до рН 5,5 стерильним розчином лугу з колб, об'ємом 258 мл, за показами датчика рН.

Далі через трубу перетискування перекачують з посівного апарату інокулят об'ємом 14,44 л. Вмикають перемішування та аерацію, в сорочку ферментера подають оборотну воду.

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.	Зомчак В.В.				РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.	Грегірчак Н.М.						115	142	
Консультант	Клименко О.М.					Кафедра БТМ ¹¹⁷			
Н.Контр.									
Затверд.	Пирог Т.П.								

Для гасіння піни, що утворюється в процесі культивування використовують стерильний піногасник.

Процес культивування здійснюється при температурі $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, рН – $5,0 \pm 0,5$ з частотою обертів перемішуючого пристрою $\omega = 400 \pm 10$ об/хв (мішалка Раштона), та аерацією 153,6 л (1,2 л на 1 л КР в хвилину) впродовж 16 годин. Рівень рідини в апараті – 128 ± 2 л, рівень піни в апараті – 70% від заповненості апарату, тиск в апараті під час стерилізації середовища - 0,15 МПа.

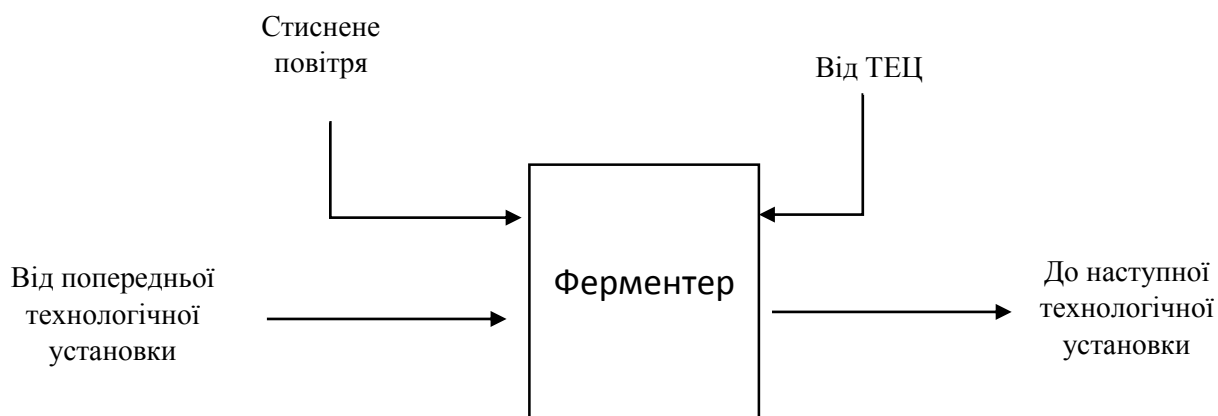


Рис. 9.1. Машино-апаратурна схема технологічного процесу

Оскільки оптимальна температура росту даного мікроорганізму є 37°C , а в аеробних процесах вирощування продуцента спостерігається значне тепловиділення, то для підтримання температури застосовують охолодження ферментера зворотною водою, яка подається в змійовики-теплообмінники або в секційну сорочку. Тобто температура регулюється шляхом витрати холодної води.

Значення рН повинно бути сталим та не змінюватись в процесі культивування, оскільки перед початком культивування даний показник регулюється титрувальними агентами і в процесі культивування немає чинників, які впливають на його зміну.

Оскільки рівень рідини не змінюється в процесі культивування, то відбувається тільки контроль даного показника.

Концентрація розчиненого кисню контролюється та регулюється впливом на витрату стисненого повітря, яке подається в ферментер.

Інтенсивність перемішування теж повинно бути сталим та рівномірним, тому даний показник управляється дистанційно «пуск/стоп» двигуна.

Надлишковий тиск не змінюється, тому він тільки контролюється.

Рівень піни є дискретним поняттям, даний показник управляється за допомогою ручного внесення піногасника з колб на вимогу датчика [158].

Завдання на розробку системи автоматизації

Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Припустиме значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю чи управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
Виробничий ферментер	Температура середовища	$37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
			Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату холодної води
	Рівень рН середовища	$5 \pm 0,5$	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
	Рівень рідини в апараті	$128\text{л} \pm 2\text{л}$ 60%	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
	Концентрація розчиненого кисню	153,6 л (1,2 л на 1 л КР)	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
			Регулювання	Слідкуюче	Вплив на витрату стисненого аераційного повітря
	Інтенсивність перемішування	$400 \text{ об/хв} \pm 10 \text{ об/хв}$	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
			Управління	Дистанційне	Пуск/стоп двигуна
	Надлишковий тиск в апараті	0,15 МПа	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
	Рівень піни в апараті	70% від заповнення апарата	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
			Управління	Ручне	Заливається з колб

9.2 Опис схеми автоматизації з специфікацією засобів автоматизації

У першому контурі автоматичного контролю і управління в ферментері необхідно контролювати температуру середовища, яке має значення 37°C і має припустимі межі $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві.

Для регулювання температури передбачається її **стабілізація** на заданому значенні за рахунок зміни витрати холодної води в сорочку ферментера, яка змінюється пневматичним виконавчим механізмом.

Враховуючи, що вимірювання температури середовища відбувається безперервно в часі в певному діапазоні, тому необхідно розглядати приклади контролю в яких від датчика отримується аналоговий (неперервний) сигнал. При цьому сам датчик розташований «по місцю».

У другому контурі автоматичного контролю і управління необхідно контролювати значення величини рН середовища в ферментері, який має регламентоване значення 5 од.рН і має припустимі межі $\pm 0,5$ од.рН. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація, стабілізація) цих змін в його архіві. Регулювання значенням величини рН не передбачається. При цьому сам датчик розташований «по місцю».

У третьому контурі автоматичного контролю і управління необхідно контролювати рівень рідини в технологічному апараті, який має регламентоване значення 60% і має припустимі межі $\pm 3\%$. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві. Регулювання рівня рідини не передбачається. При цьому сам датчик розташований «по місцю».

У четвертому контурі автоматичного контролю і управління необхідно контролювати і регулювати концентрацію розчиненого кисню в середовищі, який становить 153,6 л (1,2 л на 1 л КР). Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві.

Для регулювання концентрацію розчиненого кисню передбачається **слідкуюче регулювання** на заданому значенні, за рахунок впливу на витрату стисненого аераційного повітря. При цьому сам датчик розташований «по місцю».

У **п'ятому контурі** автоматичного контролю і управління необхідно контролювати і управляти швидкістю перемішування який має регламентоване значення 400 об/хв і має припустимі межі ± 10 об/хв. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві. Управління здійснюється дистанційно за рахунок пуск/стоп двигуна. При цьому сам датчик розташований «по місцю».

У **шостому контурі** автоматичного контролю і управління необхідно контролювати надлишковий тиск в апараті, який має значення 0,15 МПа і має припустимі межі ± 20 кПа. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві.

Враховуючи, що вимірювання тиску відбувається безперервно в часі в певному діапазоні, тому необхідно розглядати приклади контролю в яких від датчика отримується аналоговий (неперервний) сигнал. При цьому сам датчик розташований «по місцю».

У **сьомому контурі** автоматичного контролю і управління необхідно контролювати і управляти рівнем піни в апараті з сигналізацією досягнення верхнього припустимого рівня і ручним управлінням подачі піногасника у ферментер. В схемі буде використаний тільки один електрод, який встановлюється в точці яка відповідає верхньому припустимому рівню 1,0м. Сигналізація про досягнення верхнього рівня передбачається на АРМі оператора-технолога. При цьому сам датчик розташований «по місцю» [158].

Специфікація приладів

№ прикла ду	№ позиції за схемою	Параметр	Найменування і технічна характеристика виробу	Тип, модель	Вироб- ник
1	2	3	4	5	6
1	1а	Температура	Термометр опору, матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, градувальна характеристика Pt100, діапазон вимірювань: - 80...+600 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 25бар, приєднання G1/2	1-3, ТСП(Pt100)	ПАО „Тера”, Україна
	1б		Електропневматичний перетворювач, вхідний сигнал 4...20мА, вихідний сигнал 20...100кПа	2713-WP	Dwyer
	1в		Мембранний виконавчий механізм прямої дії з пневматичним позиціонером, управляючий сигнал 20...100кПа, умовний хід вихідного елементу 25мм	МИМ200-113	ГідроЕнерго-Снаб
2	2а	Рівень рН	Для вимірювання рН водних розчинів у стаціонарних умовах промислового підприємства	рН- 101П	ООО Компания «Химснаб-жение» м. Харків
3	3а	Рівень рідини	Ємнісний датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 265-4000мм, максимальна допустима температура +125 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 10бар, під'єднання G5/4, аналоговий вихід, точність 2мм	NMC	Kobold

4	4a	Концентрація кисню	Датчик розчиненого кисню	DASGIP PHPO	Mettler Toledo
	4б		Електропневматичний перетворювач, вхідний сигнал 4...20мА, вихідний сигнал 20...100кПа	2713-WP	Dwyer
	4в		Мембранний виконавчий механізм прямої дії з пневматичним позиціонером, управляючий сигнал 20...100кПа, умовний хід вихідного елементу 25мм	МИМ200-113	ГідроЕнерго-Снаб
5	5a	Перемішування	Частотний перетворювач	Altivar 71	“СВ Альтера” м.Київ
6	6a	Тиск	Електроконтактний манометр, матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, діапазон вимірювань 0...10бар, під’єднання G1/2, клас точності 1,0, вихідний сигнал дискретний	ДМ Сг 05 160	ПАО „Склоприбор”, Україна
7	7a	Рівень піни	Оптичний датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; максимальна допустима температура 80 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 10бар, під’єднання G1/2, вихідний сигнал дискретний	OPT	Kobold

РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердин, рідких та газоподібних відходів

Рідкі відходи представлені супернатантом (після центрифугування), а також відпрацьованими розчинами миючих та дезінфікуючих речовин.

Тверді відходи етапу санітарної підготовки виробництва і підготовки поживних середовищ представлені пакувальною тарою для мийних та дезінфікуючих засобів і компонентів поживного та захисного середовища.

Тара для мийних засобів - це поліетиленові мішки та банки. Компоненти середовищ зберігають у поліпропіленових та поліетиленових мішках.

Газоподібні відходи утворюються на етапі отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу, (вуглекислий газ), пилоподібних домішок (процес подрібнення), а також відпрацьоване повітря (процес перевірки обладнання на герметичність).

10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

10.2.1 Системи знешкодження та утилізації рідких відходів

Очищення рідких відходів відбувається в мембранному біореакторі (МБР).

В основу роботи МБР покладено сукупне використання біотехнологічного синтезу (очищення з використанням активного мулу) і технології поділу водних суспензій на ультрафільтраційних полімерних мембранах [159].

Мембранний модуль використовується для поділу мулової суміші і представляє собою альтернативу методів, що широко застосовується, а саме осадження активного мулу у вторинних відстійників, що притаманна традиційним системам біологічного очищення в аеротенках. Стічні води, очищені з використанням такої технології, можна використовувати в системі зрошення, призначеної для поливу міських зелених насаджень.

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Зомчак В.В.					123	142
Перевір.		Грегірчак Н.М.						
Консультант								
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ ¹²⁵		

Існує два типи МБР: з внутрішнім розташуванням мембрани (занурені в воду, що очищається, мембрани є невід'ємною частиною біологічного реактора) та зовнішнім розташуванням мембран (мембрани відділені від технологічних ємностей і вимагають установки проміжних перекачувальних насосів) [159].

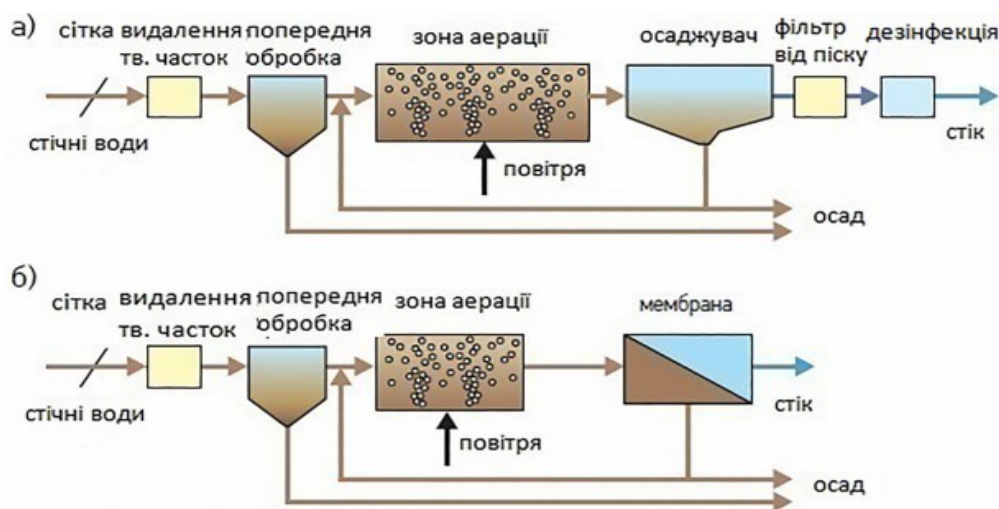


Рис. 10.1 Схема очищення стічних вод:

а) з використанням традиційного очищення активним мулом;

б) з використанням МБР

Технологія з використанням МБР, у порівнянні з класичною технологією очистки стічних вод має низку переваг серед яких: можливість, без включення в технологічну схему додаткових блоків, глибокого очищення стічних вод від забруднюючих речовин до показників, які відповідають вимогам щодо скидання стічних вод у природні водойми всіх категорій, а також коригування продуктивності без зміни технологічного процесу; зниження маси і габаритів ємнісних споруд на 20–40%, так як активний мул займає менший об'єм при більш високій концентрації, та скорочення площі, що займає обладнання, у 2–3 рази шляхом заміни вторинних відстійників, блоків доочистки, мулових майданчиків на мембранну доочистку; забезпечення високої якості очищеної води, що дозволяє відмовитись від подальшого освітлення та дезінфекції; отримання малої кількості надлишкового активного мулу, що значно впливає на вартість його механічного зневоднення та утилізацію [160].

10.2.2 Системи знешкодження та утилізації твердих відходів

Тверді відходи представлені поліетиленовою тарою. Переробка

полімерних відходів у нові матеріали і вироби – найбільш економічно доцільний шлях їх використання. Оскільки вторинна переробка полімерних відходів приблизно в два рази менше енергоємна, ніж виробництво первинних полімерів, оскільки при цьому економиться нафтова сировина, то рециркуляція полімерних відходів виявляється економічно вигідною.

Промислові полімерні відходи піддаються багатоетапній переробці.

Залежно від стану полімерних відходів (їх складу, забрудненості, рівня деструкції) вони або переробляються як суміш полімерів, або розділяються на індивідуальні компоненти.

Полімерні відходи, піддаються подрібненню для формування часток певного розміру і форми для зменшення об'єму і гомогенізації потоку сировини.

Подрібнення - механізує процес переробки, підвищує якість матеріалу за рахунок усереднення його технологічних характеристик, скорочує тривалість інших технологічних операцій, спрощує конструкцію переробного устаткування.

Основну частину полімерних відходів складають термопласти. Оскільки це еластичні матеріали, то найкращим способом подрібнення є різання. Різальні млини, подрібнювачі, різакі гільйотин і пили використовуються для різання профілів, плівок і інших полімерних відходів.

Метою фракціонування є розподіл часток подрібненої сировини за розміром і формою (здійснюється за допомогою ситових, проточних або валкових екранів).

Промивання очищає сировину і видаляє бруд. Етапи: вимочування, зачистка та видалення бруду. Після стадії промивання змішані полімерні відходи можуть бути розділені і класифіковані за видами пластиків або перероблятися далі єдиною масою.

Просушування зменшує вміст води в матеріалі після процедур промивання до прийнятного рівня. Вміст залишкової води повинен становити не більше 1 %.

Метою грануляції є отримання однакових за формою і розміром гранул,

що необхідно для спрощення поводження з матеріалом. Кінцевий вторинний полімерний матеріал, придатний для переробки у виробі на стандартному устаткуванні переробки пластмас, отримують за допомогою грануляції. Пластмасу розплавляють в екструдері і надають матеріалу форми гранул за допомогою гранулюючого диска [161].

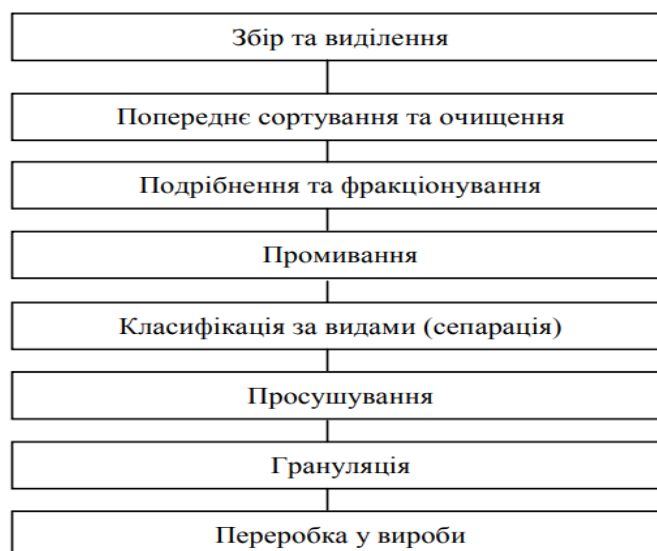


Рис. 10.2. Схема попереднього оброблення полімерів [161].

10.2.3. Системи знешкодження та утилізації газоподібних відходів

Газоповітряні відходи представлені пилоподібними викидами в атмосферу та вуглекислим газом після культивування.

Очисна апаратура мокрого уловлювання аерозолів застосовуваний для очищення газів від діоксиду сірки, сірководню, хлороводню, хлору, оксиду і діоксиду вуглецю, фенолів.

Для очищення викидів від газоподібних (діоксид вуглецю, який утворюється під час культивування дріжджів), пилоподібних домішок (процес подрібнення) та відпрацьованого повітря (перевірка обладнання на герметичність) застосовують інтенсивну масообмінну апаратуру - пінні апарати, безнасадковий форсунковий абсорбер, скрубер Вентурі, що працюють при високих швидкостях газу. Пінні абсорбери працюють при швидкостях від 1 до 4 м/с і забезпечують високу швидкість абсорбційної-десорбційних процесів, є малогабаритними. При достатньому числі ступенів очищення досягаються високі показники очищення (до 99,9%). Для очищення газів від аерозолів і

шкідливих газоподібних домішок використовують пінні апарати зі стабілізатором пінного шару. Вони прості за конструкцією і працюють в режимі високої турбулентності при лінійній швидкості газу до 4-5 м/с.

На рис. 10.3. наведена схема абсорбції та десорбції CO_2 проводиться в пінних абсорберах. Установка безвідходна, так як чистий діоксид вуглецю після зрідження передається споживачеві у вигляді товарного продукту [162].

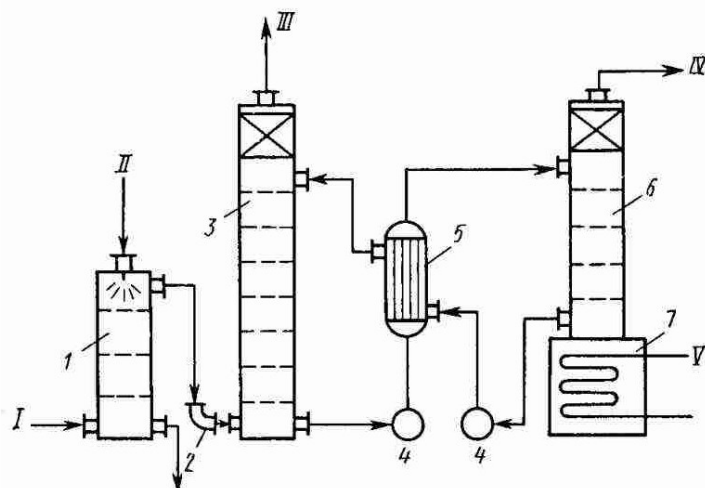


Рис. 10.3 Схема абсорбційної очистки газів від CO_2 з отриманням товарного діоксиду вуглецю: 1 - холодильник; 2 - повітрорудка; 3 - пінний абсорбер; 4 - насос; 5 - теплообмінник; 6 - пінний десорбер; 7 - кип'ятильник десорбера; I - газ на очищення; II - вода; III - очищений газ; IV – CO_2 споживачеві; V – пар [162].

10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Кількість рідких та твердих відходів не є великою, тому не потребує заходів зменшення.

Для зменшення об'ємів газоповітряних відходів відпрацьоване очищене повітря після ферментації також можна використовувати для споживання *Nostoc sp.*, *Nostoc linckia*, *Anabaena flos-aquae*, *Lyngbya limnetica*, *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum gracile*, *Ankistrodesmus braunii*, *Dunaliella salina*. Одна тонна фотопланктону при своєму зростанні поглинає 1,6 тонн CO_2 , генеруючи при цьому 1,2 тонни кисню [163].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Dutta A.K., Chacko A. Influence of environmental factors on the onset and course of inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* 2016, 22(3): 1088–1100. doi: 10.3748/wjg.v22.i3.1088.
2. Лях В. Р., Червецова В. Г., Кричковська А. М. Пробиотики як сучасні превентивні препарати захворювань шлунково-кишкового тракту. *J. Chem., Techn. and Application of Substances.* 2018, 1(1).
3. Kim S.K., Guevarra R.B., Kim Y.T., Kwon J., Kim H., Cho J.H., Kim H.B., Lee J.H. Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. *J. Micr. Biotech.* 2019, 29(9):1335-1340. doi: 10.4014/jmb.1906.06064.
4. Pace F., Pace M., Quartarone G. Probiotics in digestive diseases: focus on Lactobacillus GG. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2015, 61(4):273-92.
5. Wilkins T., Sequoia J. Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. *Am Fam Physician.* 2017, 96(3):170-178.
6. Yıldırım H., Kılıç G.B., Karahan A.G. Probiotic Yeasts and Their Properties. *J. of Agr: Food Sci. and Techn.* 2017, 5(10): 1148-1155. doi: 10.24925/turjaf.v5i10.1148-1155.1239.
7. Рябцева С.А., Сазанова С.Н., Дубинина А.А. *Saccharomyces boulardii* II, как потенциальный пробиотик для инновационных пищевых продуктов. 2019, (2): 138-150 с. doi: [10.33236/2307-910X-2019-2-26-138-150](https://doi.org/10.33236/2307-910X-2019-2-26-138-150).
8. Ткаченко Е.И., Сказыбаева Е.В., Авалуева Е.Б., Ситкин С.И. *Saccharomyces boulardii* (Энтерол®) в практике терапевта и гастроэнтеролога. 2010, (1): 23-24с.
9. https://24tv.ua/ru/medicine/pills/jenterol_p162. Энтерол: инструкция, применение, цена.

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Список використаної літератури	Лім.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Зомчак В.В.						128	142
Перевір.	Грегірчак Н.М.							
Консультант								
Н.Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.					Кафедра БТМ 130		

10. <https://health-ua.com/article/42775-probotik-Saccharomyces-boulardii-sNCM-I745-upraktitc-gastroenterologa>. Пробиотик *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 у практиці гастроентеролога.
11. Новошкинов А.А., Соколова Н.В. Бережкова Т.В., Ларина Т.С.. Клиническая эффективность пробиотика «Энтерол» в комплексной терапии острых кишечных инфекций у детей. 2006, (2): 43-47 с.
12. [http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[23008\]](http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[23008]). Інструкція для медичного застосування лікарського засобу.
13. <https://apteka911.com.ua/shop/enterol-por-d-oral-prim-pak-250mg-10-p644>. Энтерол пор. д/орал. прим. пак. 250мг №10.
14. <https://1sa.com.ua/enterol.html>. Энтерол.
15. Бабінець О.М. Біологічні властивості пробіотиків після іммобілізації на ентеросорбентах і низькотемпературного зберігання: Автореф. дис. канд. мед. наук. Харків, 2016. 213с.
16. Хижняк О.С., Краснопольський Ю.М. Біотехнологічні аспекти створення препаратів на основі пробіотиків. 2012, 44(950): 72 – 78 с.
17. Колісник Г.В., Камінська М.В., Борецька Н.І., Нечай Г.І., Сімонова М.І., Гураль С.В., Влізло В.В. Молекулярно-біологічні механізми дії дріжджів на організм тварин. *Біологія тварин*, 2010, 12(2): 54-62 с.
18. <https://www.thorne.com/products/dp/sacro-b-trade>. Sacro-B™.
19. <https://vitamines.com.ua/ru/sakharomitsety-bulardi-jarrow-formulas-30-kapsul/>. Сахаромицеты буларди, Jarrow Formulas, 30 капсул.
20. <https://usavitamines.com/sakharomitsety-bulardi-saccharomyces-boulardii-now-foods-60-kapsul-now-02934/>. Сахаромицеты буларди, *Saccharomyces Boulardii*, Now Foods, 60 капсул, (NOW-02934).
21. <https://vitamins.in.ua/p953112723-zhou-nutrition-saharomitsety.html>. Zhou Nutrition, Сахаромицеты Буларди, желудочно-кишечный пробиотик, 60 вегетарианских капсул.

22. <https://www.naturalchemist.com.au/spectrumceuticals-sb-250-saccharomyces-boulardii-60-capsules/>. Spectrumceuticals SB 250 *Saccharomyces Boulardii* 60 Capsules.
23. https://vitamins.in.ua/p711323988-kal-saccharomyces-boulardii.html?utm_source=ga&utm_medium=shopping&utm_campaign=all&utm_content=merchant&utm_term=711323988&gclid=EAIaIQobChMIwceuxZnA6AIVmpntCh2iqwBrEAQYAyABEgIjw_D_BwE. KAL, *Saccharomyces Boulardii* 8 Billion, 60 VegCaps.
24. <https://vitamins.in.ua/p597013949-saharomitsety-bulardi-saccharomyces.html>. Сахаромицеты Буларди, *Saccharomyces Boulardii*, Klaire Labs, 60 Вегетарианских Капсул.
25. Pereyra C.M., Gil S., Cristofolini A., Bonci M., Makita M., Monge M.P., Montenegro M.A., Cavaglieri L.R. The production of yeast cell wall using an agroindustrial waste influences the wall thickness and is implicated on the aflatoxin B1 adsorption process. *F. Res. Inter.* 2018. (111): 306-313. doi: 10.1016/j.foodres.2018.05.026.
26. Chin T. S., Othman N.Z., Malek R.A., Elmarzugi N., Leng O.M., Ramli S., Musa N.F., Aziz R. and Enshasy H.E. Bioprocess optimization for biomass production of probiotics yeast *Saccharomyces boulardii* in semi-industrial scale. *J. of Chem. and Pharm. Research.* 2015, 7(3): 122-132.
27. Luong D.T., Hang H.T, Hop D.V. Culture Condition for High Biomass Production of Probiotic Yeast *Saccharomyces Boulardii* SB2 in Shake Flask and 30 Litre Scale. *VNU J. of Science: Nat. Sci. and Techn.* 2019, 35(3): 47-55.
28. Lesage G. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* – June 2006. – P. 317-342
29. Dickinson J.R. Comparative genomic hybridization provides new insights into the molecular taxonomy of the *Saccharomyces sensu stricto* complex *Genome Res* / J.R. Dickinson et al. // *The Scientific World Journal.* – 2004. – P. 1043-1051
30. Старовойтова С.О. Технологія пробіотиків / С.О. Старовойтова, О.І. Скроцька, Т.П.Пирог; Нац.ун-т харч.технологій. – К.: НУХТ, 2012. – 318 с.

31. Łukaszewicz M. 2012. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* – Probiotic Yeast, Probiotics. – 2012. – P. 385-398
32. McFarland L.V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients // World Journal of Gastroenterol. – 2010 – P. 2202-2222. – Access mode: <https://www.wjgnet.com>
33. <https://ivanofrankivsk.oxford-med.com.ua/viddilennya/simeyna-medycyna/likuvannya-zahvoryuvan-shlunkovo-kyshkovoho-traktu/>. Лікування захворювань шлунково-кишкового тракту.
34. Алгоритм діяльності сімейного лікаря при основних захворюваннях шлунково-кишкового тракту : навч.-метод. посіб. для студентів VI курсу медичного факультету спеціальності «Лікувальна справа», «Педіатрія» за програмою навчальної дисципліни «Загальна практика – сімейна медицина» / Н. С. Михайловська, О.О. Лісова. – Запоріжжя: ЗДМУ, 2019. – 179 с.
35. Копча В.С., Деркач С.А., Ситник О.М Удосконалення лікування хворих на гострі кишкові інфекції. *Ж. Гострі та невідкладні стани у практиці лікаря*. 2013, 2-3(35).
36. Ткач С.М. Применение *Saccharomyces boulardii* в современной клинической практике. 2019, 3 (53).
37. Хижняк О.С. Розробка складу та біотехнології отримання комплексного пробіотичного препарату: Автореф. дис. канд. фарм. наук. Харків, 2016. 204 с.
38. Dinleyici E.C., Eren M., Ozen M., Yargic Z.A. Effectiveness and safety of *Saccharomyces boulardii* for acute infectious diarrhea. Expert Opin. Biol. Ther. – 2012. – Vol.12, I.4. – P. 395–410. doi: 10.1517/14712598.2012.664129
39. Kelesidis T, Pothoulakis C. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. T.A.G. – 2012. – Vol.5, I.2. – P. 111–125. doi: 10.1177/1756283X11428502
40. Łukaszewicz M. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* – Probiotic Yeast // InProbiotics. – 2012. IntechOpen. doi: 10.5772/50105.

41. Сахно Н.Г., Гунар О.В. Лекарственные препараты на основе *Saccharomyces boulardii* и основные показатели их качества // Успехи медицинской микологии. – 2013 – № 11. – С. 368–370.
42. Конча В.С. Антибіотикорезистентність пробіотиків: роздуми і факти // Інфекційні хвороби. – 2009. – №4. – С.46–47.
43. Feizizadeh S., Salehi-Abargouei A., Akbari V. Efficacy and safety of *Saccharomyces boulardii* for acute diarrhea // Pediatrics. – 2014. – Vol.134, I.1. – P.176–191. doi: 10.1542/peds.2013-3950
44. [http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[29576\]](http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[29576]). Нормагут.
45. <https://compendium.com.ua/dec/274520/>. Нормагут (Normagut).
46. <https://compendium.com.ua/dec/271811/>. Міцерол.
47. <http://myrgorod.pl.ua/news/jak-vberegtysja-vid-gostryh-kyshkovyh-infektsij-ta-harchovyh-otrujen>. Як вберегтися від гострих кишкових інфекцій та харчових отруєнь.
48. Крамарьов С.О., Закордонець Л.В. Сучасні підходи до антибактеріальної терапії гострих кишкових інфекцій. *Aktual'naâ Infektologiâ*.2018; 6(3):119-123. doi: 10.22141/2312-413x.6.3.2018.136643.
49. https://www.rxlist.com/saccharomyces_boulardii/supplements.htm. *Saccharomyces boulardii*.
50. <https://enterol.ua/instrukciya/> ЕНТЕРОЛ 250.
51. <http://gkb15.moscow/news/6592/>. Опыт лечения псевдомембранозного колита.
52. Марушко Ю.В., Асонов А.О. Доказова база застосування окремих пробіотиків при антибіотикоасоційованій діареї в дітей. *Ж. Здоров'я дитини*. 2018, 13(5).
53. <https://biaktina.ua/uk/preparaty/oferera-ua>. Опефера (Opefera).
54. Волошина И.Н., Шидловская О.А., Бойко Т.А. Использование *saccharomycus* в животноводстве. Матеріали VIII Міжнародної науково-практичної онлайн конференції студентів, аспірантів та молодих вчених

«БІОТЕХНОЛОГІЯ: ЗВЕРШЕННЯ ТА НАДІЇ» (15 листопада 2019 року, м. Київ). – с 122-123.

55. Roos E.O., Olea-Popelka F., Buss P., Klerk-Lorist L.M., Cooper D., Helden P. D., Parsons S. D. C., Miller M. A. Seroprevalence of *Mycobacterium bovis* infection in warthogs (*Phacochoerus africanus*) in bovine tuberculosis-endemic regions of South Africa. *Transbound Emerg Dis* 2018, 65(5):1182-1189. doi: 10.1111/tbed.12856.

56. Рябцева С. А., Сазанова С. Н., Дубинина Д. А. *Saccharomyces boulardii*, як потенційний пробіотик для інноваційних харчових продуктів. 2019, 2(6). DOI: [10.33236 / 2307-910X-2019-2-26-138-150](https://doi.org/10.33236/2307-910X-2019-2-26-138-150)

57. <https://vnk1.kiev.ua/disease/enterol-instrukciya-iz-zastosuvannya-doroslim-i-dityam/>. Ентерол: інструкція із застосування дорослим і дітям.

58. Степанов Ю.М., Скирда І.Ю., Петішко О.П. Хвороби органів травлення — актуальна проблема клінічної медицини. *Gastroenterologia* 2019, 53(1):1-6. doi: 10.22141/2308-2097.53.1.2019.163450.

59. <https://znaj.ua/medical/23313-enterol-250>. Ентерол 250

60. <https://compendium.com.ua/uk/makers/66/27/biocodex/>. Biocodex Ukraine.

61. Основи проектування біотехнологічних виробництв: метод. рекомендації до викон. курс. проекту для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навч. / уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2015. – 92 с.

62. https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?sce00010 Glycolysis - *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast)

63. Пастушенко А.С., Храмов Н.С., Норинський О.І., Гиль М.І. Процеси і апарати біотехнологічного виробництва. Метод. реком. Миколаїв, 2016. 49 с.

64. Пирог, Т.П. Загальна біотехнологія: підручник / Т.П. Пирог, О.А. Ігнатова. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.

65. <http://ukrefs.com.ua/print:page,1,90630-Konstrukcii-meshalok.html>. Конструкції мішалок.

66. Вус Д., Чумаков Г. Дослідження масопередачі при перемішуванні турбінною мішалкою в посудинах з відбивними перегородками. 2008, 23(1): 171-176 с.
67. <https://www.slideshare.net/ViktorStabnikov/6-86011929>. Стабников В.П. Технологічні принципи біотехнологічних виробництв.
68. <https://www.slideshare.net/ViktorStabnikov/5-86011835>. Технологічні принципи біотехнологічних виробництв.
69. Устаткування асептичних і неасептичних виробництв лікарських засобів. Конспект лекцій для студентів спеціальності 133 “Талузеве машинобудування» спеціалізація «Обладнання фармацевтичних та біотехнологічних виробництв» / Уклад.: В.М. Поводзинський, В.Ю. Шибєцький – К.: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017. – 251с/.
70. Пастушенко А.С., Храмов Н.С., Норинський О.І., Гиль М.І. Процеси і апарати біотехнологічного виробництва. Метод. реком. Миколаїв, 2016. 49 с.
71. <http://www.envirco.in.ua/filterklass.html>. Таблиця класифікації повітряних фільтрів.
72. <https://studfile.net/preview/7443252/page:54/>. Схеми очистки повітря у виробництві лікарських засобів.
73. <https://iceclimate.com.ua/filtr-absoljutnoj-ochistki-epa-hepa-ulpa> Фільтр абсолютної очистки HEPA, HEPA, ULPA.
74. <https://alterair.ua/uk/product/vozdushnyye-panelnyye-filtry-gruboy-ochistki-g1-g4/>. Панельні повітряні фільтри для грубого очищення.
75. [https://alterair.ua/uk/product/panelnyye-vozdushnyye-filtry-dlya-tonkoy-ochistki-vozdukha-\(f7-f9\)/](https://alterair.ua/uk/product/panelnyye-vozdushnyye-filtry-dlya-tonkoy-ochistki-vozdukha-(f7-f9)/). Панельні повітряні фільтри для тонкого очищення повітря.
76. http://tehnograd.kiev.ua/ru/filtri_dlya_sistem_ventiljacii/hepa_filtri.html HEPA фильтры.
77. Конспект лекцій з дисципліни „Загальна біотехнологія» для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія»/ Укл.: старший викладач Філімоненко О.Ю. – Дніпродзержинськ, ДДТУ, 2016. – 157 с.

78. Шаповал Й. М., Полюжин І. П., Цюпко Ф. І., Полюжин Л. І. Оцінка ефективності піногасників для водних розчинів поліакриламід у та лауретсульфату натрію як основи мастильно-охолоджувальних технологічних рідин. *Статті «Львівська політехніка»*. 2017, № 838: 419-427.
79. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/525/silikoni>. Силікони.
80. <https://diol.ub.ua/analitic/33597-pinogasnik-silikonoviy-osoblivosti-ta-perevagi.html>. Піногасник силіконовий: особливості та переваги.
81. <https://siloxane.ub.ua/goods/view/2569692/all/pinogasnik-brb-snapsil-tg-30/>. Піногасник BRB Snapsil TG 30.
82. Черепанський В.В., Грегірчак Н.М. Особливості технологічного процесу виробництва пробіотичного препарату на основі лактобацил. *Scientific Works of NUFT*. 2020, 26 (3): 45-59 с.
83. Методичні вказівки до виконання практичних робіт з навчальної дисципліни «Машини та обладнання для біотехнологій» (частина 1) / Голотюк М. В. – Рівне : НУВГП, 2020. – 42 с.
84. Біотехнології в екології. Методичні рекомендації до самостійної роботи студентів / А.І. Горова, С.М. Лисицька, А.В. Павличенко та ін. – Д.: Національний гірничий університет, 2012. – 23 с.
85. <https://www.slideshare.net/YuriPenchuk/2-75375860>. Загальна біотехнологія Лектор: доц. Пенчук Ю.М.
86. Черевко О. І, Поперечний А. М. Процеси і апарати харчових виробництв: підручник / О. І. Черевко, А. М. Поперечний. 2-е видання, доп. та випр. Х.: Світ Книг, 2014. 495 с
87. Doran P. M. Unit Operations. Bioprocess Engineering Principles. 2013. P. 445—595.
88. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв: консп. лек. для студ. напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навч. / Уклад.: Ю.В.Карлаш - К: НУХТ, 2013. – 143 с.

89. Барышников Н. А., Беляков Г. В., Таирова А. А., Филиппов А. Н. Фильтрация суспензии через пористую среду с учетом гравитации. Мембраны и мембранные технологии. 2016. Т. 6, № 1. С. 92—98
90. Апарати мікробіологічної промисловості: навч. посібник/ Данилов І.П., Самійленко С.І.- Харків: НТУ «ХПІ», 2008. - 272 с.
91. Флотация. URL: <https://medic.studio/biotehnologii/flotatsiya-70593.html> (дата звернення 17.02.2020).
92. Методичні вказівки щодо виконання практичних робіт з навчальної дисципліни «Управління якістю та безпека біотехнологічної продукції» для студентів денної форми навчання зі спеціальності 101 – «Екологія» освітньо-професійної програми підготовки «Екологічна біотехнологія та біоенергетика» освітньо-кваліфікаційного рівня «Магістр»
93. Кукла О.Л., Канюк М.І., Стародуб М.Ф., Нагорна С.С. Мультибіосенсор на основі дріжджових клітин для визначення глюкози і сахарози у водних розчинах. 2005, 21 (4): 346-350. DOI:10.7124/bs.0006FB
94. Усовершенствование процесса лиофильного высушивания иммунобиологических препаратов на современном оборудовании / [В. Г. Пушкарь, И. В. Новицкая, М. Я. Кулаков та ін.]. // Вестник ВолгГМУ. – 2011. – №4. – С. 65–68.
95. Шульга С. М., Тігунова О.О., Ткаченко А.Ф., Бейко Н.Є., Хоменко А.І. Вплив ліофілізації на життєздатність вплив ліофілізації на життєздатність дріжджів дріжджів *Pichia anomala*. 2011, 4 (4):80-86.
96. Похилено В. Д., Баранов А. М., Детушев К. В. Методы длительного хранения коллекци онных культур микроорганизмов и тенден ции развития // Изв. высш. уч. зав. По волж. рег. — 2009. — № 4. — С. 99–121
97. Broeckx G., Vandenneuvel D., Claes I. J., et al. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. Int J Pharm. 2016. Vol. 505, N. 1—2. P. 303— 18
98. Зниження виробничих витрат на електроенергію та дезинфекція термобарокамери для ліофілізації продуктів медичного значення. 2019

99. Fowler A., Toner M. Cryo-injury and biopreservation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2005. Vol. 1066. P. 119—135.

100. Воловик Т.Н. Исследование устойчивости защитной формы пробиотиков в условиях желудочно-кишечного тракта *in vitro* / Т.Н. Воловик, Л.В. Капрельянц, М.И. Гоцуленко // Наукові праці. Біотехнологічні аспекти виробництва продуктів функціонального призначення. – 2010. – Т.2, № 40. – С. 151 – 154.

101. Обладнання хімічних виробництв : конспект лекцій / укладач М. П. Юхименко. – Суми : Сумський державний університет, 2015. – 119 с.

102. <https://uapatents.com/2-1659-dezintegrator.html>. Дезінтегратор

103. Конспект лекцій до розділу «Механічні процеси» з курсу —Процеси та апарати хімічних виробництв» для студентів III-IV курсів механічних спеціальностей / Укл. С.О. Опарін. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2012. – 112 с.

104. https://tehnolog.com.ua/uk/catalog/bulk_mixers/hammer_mills/.

Молоткові млини

105. Fenster K., Freeburg B., Hollard C., et al. The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. Microorganisms. 2019. Vol. 7, № 3

106. Glass as a packaging material in pharmaceutical packaging. URL: <https://www.shdeshare.net/shwetashelke35/glass-as-a-packagmg-material-in-pharmaceutical-packaging-71496789> (дата звернення 26.01.2020).

107. Guergoletto K., Sivieri K., Tsuruda A., et al. Food Industrial Processes — Methods and Equipment. Dried Probiotics for use in functional food applications. Benjamin Valdez (ed.), InTech, Shanghai, China. 2012. P. 227—235.

108. Das S., Bhattacharjee D., Manna A., Basu S. et al. Effect of different excipients and packaging materials on commercial preparation of probiotic formulation. Das, et al., IJPSR. 2014. Vol. 5, N. 5. P. 1830—1836.

109. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 Лікарські засоби. Належна виробнича практика.

110. Поводзинський В.М. Чисті приміщення у виробництві лікарських засобів. Обладнання систем вентиляції. *Internat.l Scientific J. "Internauka"*
111. Поводзинський В.М. Основи проектування: Конспект лекцій для студ. спец. 6.092900 "Промислова біотехнологія" та 6.092902 "Біотехнологія біологічно активних речовин", напряму 0929 "Біотехнологія" ден. форми навч. – К.: НУХТ, 2005.
112. СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013 Лікарські засоби. Якість води для застосування у фармації
113. Вода очищена // Державна Фармакопея України. — 1-ше вид. — Доповнення 4. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. — С. 389–391.
114. Приходько А.Е, Валевко С.А. Методы предварительной подготовки и получения воды для фармацевтических целей. *ММА им. И.М. Сеченова, Москва*
115. <https://miralab.in.ua/dezzasoby-ta-hihiyena/zasoby-dezinfektsiyi/khlorantoin> Хлорантоін Засоби дезінфекції
116. <https://www.farmakos.ua/prod.html> Продукція НВО "Фармакос"
117. <https://farmakos.ua/bimoi.html> Порошок Биомой дезинфицирующее средство 1кг.
118. https://hlorka.in.ua/p607423965-bimoi.html?gclid=CjwKCAjw_sn8BRBrEiwAnUGJDnn0ejGmaRRdpaQig4dMUhfsXiPAyM4-YMKg0Udu4bMyfIJsxndNyRoCK6EQAvD_BwE Биомой, 1 кг
119. [https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%92%D1%96%D0%B4%D0%BA%D1%80%D0%B8%D1%82%D1%96%20%D0%B4%D0%B0%D0%BD%D1%96/2020_%D1%80%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B2%201-1006%20\(1\).pdf](https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%92%D1%96%D0%B4%D0%BA%D1%80%D0%B8%D1%82%D1%96%20%D0%B4%D0%B0%D0%BD%D1%96/2020_%D1%80%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B2%201-1006%20(1).pdf) Державний реєстр дезінфекційних засобів 2020 рік.
120. <https://deltafan.com.ua/product-category/osovi-ventylyatory/aksuary-uk/zabir-povitrya/>. Забір повітря.
121. <https://alterair.ua/uk/product/vozdushnyye-panelnyye-filtry-gruboy-ochistki-g1-g4/>. Панельні повітряні фільтри для грубого очищення.

122. [https://alterair.ua/uk/product/panelnyye-vozdushnyye-filtry-dlya-tonkoy-ochistki-vozdukha-\(f7-f9\)/](https://alterair.ua/uk/product/panelnyye-vozdushnyye-filtry-dlya-tonkoy-ochistki-vozdukha-(f7-f9)/). Панельні повітряні фільтри для тонкого очищення повітря.

123. <https://7-vz.com.ua/product/ventiljatory-centrobezhnye-kupit-vc-14-4625-ili-vr-287-461-25-srednego-davlenija/> Центробіжний вентилятор ВЦ 14-46 №2,5

124. http://paskal.ua/ua/product/teploobmenik-whe-2050_172.html. Теплообмінник WHE 2050.

125. https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php . Система підігріву повітря.

126. https://newfilter.com.ua/ru/ventiljacionnie_filtri/hepa_filtr.html. HEPA фільтр від компанії NEW FILTER.

127. http://gk-sk.ru/kompresory/katalog/ATMOS-model-Albert_E_40/. Компресор ATMOS модель: Albert E 40.

128. <http://www.kongyr.com.ua/resiver-vozdushniy-gorizontalny-rg-50-294/>. Ресивер повітряний горизонтальний РГ 50.294.

129. https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php . Система підігріву повітря.

130. <https://aurora-pack.ru/catalog/sku/reaktor-s-meshalkoy-i-rubashkoy-podogreva-emk-r-20/>. Реактор з мішалкою і сорочкою підігріву ЕМК Р-20.

131. <http://sartorius-sd.com.ua/index.php/%D1%81%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D1%83%D0%B5%D0%BC%D1%8B%D0%B5-%D0%BD%D0%B0-%D0%BC%D0%B5%D1%81%D1%82%D0%B5-%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80%D1%8B/biostat%C2%AE-cplus.html>. Ферментер | Біореактор з нержавіючої сталі для вашої лабораторії.

132. <https://azovchemservice.prom.ua/p342833041-reaktor-nerzhaveyuschej-stali.html>. Реактор з нержавіючої сталі 25 літрів.

133. <https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/pilotnyie-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus%C2%AE/pilotnyie-fermenteryi.html>. Пілотні ферментери. BIORUS®.
134. <https://technowagy.com.ua/product/dozator-vagovij-dvopotokovij/>. Дозатор ваговий двопотоковий.
135. <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rabochim-obemom-100-l/>. Реактор-ферментер РФ-100 для біологічних препаратів.
136. https://www.etatron.com.ua/pumps/peristaltic_pumps/bh3-v/ Перистальтичний шланговий насос ВНЗ-V
137. <https://mash-him.ru/apparaty-s-peremeshivayushhimi-ustrojstvami>. МашХим. Центр Химического Машиностроения.
138. https://aquavin.com.ua/catalog/nasosi_dlya_polivu/nasos_vidtsentrovij_pedrollo_2cpm_25_14a_1_5_kvt_do_100_l_khv/ Насос відцентровий Pedrollo 2CPm 25/14A 1,5 кВт до 100 л/хв
139. <https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus%C2%AE/promyishlennyye-fermenteryi.html>. Промислові ферментери. BIORUS®.
140. https://www.vicaqua.com.ua/chemical_pumps/peristaltic_pumps/mp-8/ Перистальтичний насос МР-8
141. <https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/pilotnyie-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus%C2%AE/pilotnyie-fermenteryi.html>. Пілотні ферментери. BIORUS®.
142. <http://snpo.ua/uk/produktsiya/tsentrifugi/tsentrifugi-osadzhuvalni-filtruyuchi-i-kombinovani-z-shnekovoyi-vivantazhennyam-osadu/> Центрифуги осаджувальні, фільтруючі і комбіновані з шнекової вивантаженням осаду
143. <https://www.reatorg.ru/equipment/item/steklyannaya-reaktornye-ustanovki-reatorg-technologies/> СТЕКЛЯННЫЕ РЕАКТОРНЫЕ УСТАНОВКИ REATORG TECHNOLOGIES™

144. [https://bio-rus.ru/aktualnyie-predlozheniya/pilotnaya-lifilnaya-sushilka-leo-0,6-\(10-kg-po-ldu\).html](https://bio-rus.ru/aktualnyie-predlozheniya/pilotnaya-lifilnaya-sushilka-leo-0,6-(10-kg-po-ldu).html) Ліофільна сушка Bio-Rus-4SFD
145. <https://chumaki.in.ua/ua/p606012619-izmelchitel-yf8-melnitsa.html>
Подрібнювач YF8-1 Млин молоткова дробарка
146. <https://vibro-separator.ru/kruglij-separator/> Кругле вібросито МХ
147. https://www.peterbinder.ru/catalog/gorizontalnye_mashiny_dlya_fasovki_i_upakovki_v_sashe/model_S110/ Горизонтальные машины для фасовки и упаковки в саше
148. <https://aurora-pack.ru/catalog/sku/avtomaticheskaya-mashina-dlya-upakovki-shtuchnykh-tovarov-v-korobku/> Автоматическая машина для упаковки штучных товаров в коробку
149. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
150. Бабінець О.М. Біологічні властивості пробіотиків після іммобілізації на ентеросорбентах і низькотемпературного зберігання: Автореф. дис. канд. мед. наук. Харків, 2016. 213с.
151. Загальна мікробіологія і вірусологія: лабораторний практикум для студ. освітнього ступеня «Бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми навч. / уклад. Т.П. Пирог, М.М. Антонюк. – К.: НУХТ, 2016. – 110 с.
152. Mousa A.H., Wangand G., Zhang H. Morphological and Molecular Tools for Identification of *Saccharomyces boulardii* Isolated from Active Dry Yeast. 2019, 7(4): 434-439.
153. <http://www.mysticalbiotech.in/saccharomyces-boulardii-2479388.html>.
Saccharomyces boulardii.
154. <https://aquaanalytics.com.ua/spektrofotometr-dr-6000-uf-vidimogo/>.
Спектрофотометр DR 6000 УФ і видимого діапазону.

155. Постнова О. М., Касабова К. Р., Гревцева Н. В., Шматченко Н. В. Методи контролю продукції харчових виробництв [Електронний ресурс]: опорні конспекти лекцій для студентів освітнього ступеня бакалавр спеціальності 181 «Харчові технології» спеціалізації «Технології хліба, кондитерських, макаронних виробів і харчоконцентратів»./ Постнова О. М., Касабова К. Р., Гревцева Н. В., Шматченко Н. В. – Х. : ХДУХТ, 2018. – 107 с.
156. Чупахина Г.Н. Физиологические и биохимические методы анализа растений. Практикум. – Калининград, 2000. – 59 с.
157. <http://sphu.org/viddil-dfu> Державна фармакопея України
158. Ельперін І.В. Автоматизація та управління біотехнологічним виробництвом: Метод. рекомендації до виконання індивідуального завдання з дисципліни для студентів освітнього ступеня бакалавр за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» всіх форм навчання. /Уклад: І.Ельперін – К.: НУХТ, 2017. – 44 с.
159. Сербов В.О., Мотроненко В.В. Очистка промислових стічних вод з використанням мембранних біореакторів. *Міжнар. наук. журн. «Інтернаука»*. 2016, 12(22).
160. Ногих, В.Р. Мембранный биореактор в очистке сточных вод / В.Р. Ногих, Ю.В. Бессонов // *Экология производства*. — 2012. — № 10. — С. 52–55.
161. Денисенко Т.Н. Дослідження сучасних технологій переробки пластикових виробів. *Техн. наук*. 2014, 1(71).
162. Гигина О.С. Методи і технічні засоби захисту атмосферного повітря від забруднення та очищення газів, що відходять. 2010.
163. Пальчик А.О., Бурега Н.В., .М. Фендьо О.М. Утилізація діоксиду вуглецю шляхом промислового вирощування мікроводоростей в енергосистемі на базі паливного елементу. *Енергетика і автоматика*. 2014. №4.



Research Article

ISSN : 0975-7384
CODEN(USA) : JCPRC5

Bioprocess optimization for biomass production of probiotics yeast *Saccharomyces boulardii* in semi-industrial scale

Tam S. Chin¹, Nor Zalina Othman¹, Roslinda Abd Malek¹, Nagib Elmarzugi^{1,2}, Ong Mei Leng³, Solleh Ramli¹, Nur Fashya Musa¹, Ramlan Aziz¹ and Hesham El Enshasy^{1,4}

¹Institute of Bioproduct Development (IBD), Universiti Teknologi Malaysia (UTM), Skudai, Johor Malaysia

²Faculty of Pharmacy, Tripoli University, and Biotechnology Research Center, Tripoli, Libya

³Harita Go Green Sdn. Bhd., 75450 Ayer Keroh, Melaka, Malaysia

⁴City for Scientific Research and technology Applications, New Burg Al Arab, Alexandria, Egypt

ABSTRACT

Saccharomyces boulardii is non-pathogenic probiotic yeast with many health benefits. In the present work, studies were carried out to improve cell growth kinetics to produce cell mass of this biotherapeutic yeast in semi-industrial scale. At first, five different media were screened to select the most appropriate formula for biomass production. The medium which yielded highest cell mass of 2.57 g L^{-1} and lowest ethanol was selected and further optimized by changing the concentrations of each component. The optimized medium composed of (g L^{-1}): Glucose, 20; Corn steep liquor, 15; NaNO_3 , 1.0; KH_2PO_4 , 6.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.0; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.002; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 was then used for yeast biomass production in a pilot scale 16-L bioreactor in batch culture under controlled and uncontrolled pH. The highest biomass of 8.2 g L^{-1} was achieved in pH controlled culture. This was almost double of the biomass obtained in shake flask. In conclusion, production process has been developed for high cell mass production of the biotherapeutic yeast *S. boulardii* in semi-industrial scale.

Key words: Probiotic yeast, *Saccharomyces boulardii*, Medium optimization, Semi industrial scale, stirred tank bioreactor

INTRODUCTION

Probiotics are live microorganisms or microbial mixtures which are applied to improve the patient's microbial balance, particularly the environment of the gastrointestinal tract and the vagina. Therefore, probiotic therapy has been investigated for its effectiveness against a range of gastrointestinal diseases and disorders and became one of the main components of wellness industries [1,2]. *Saccharomyces boulardii*, non-pathogenic yeast that grows optimally at body temperature, has been tested for its efficacy in the prevention of antimicrobial associated diarrhoea. This yeast is commercially available as lyophilised cells in capsule form in many countries. It has recently been used as a dietary supplement in the United States (Biocodex, Inc.). In Germany, the lyophilized form formula is under the trade name Perenterol forte® (Thiemann Arzneimittel, GmbH) and widely used for the prevention of traveller diarrhoea. Beside its probiotic properties, *S. boulardii* is also applied as biotherapeutic agent and used for specific therapeutic activity against many diseases [3]. The yeast *S. boulardii* have showed efficacy in clinical trials for the prevention of antimicrobial associated diarrhoea. However, the potential mechanism of action of this type of yeast is based on its activity for inhibition of pathogen attachment in intestine, inhibition of action of microbial toxin [4], stimulation of immunoglobulin A [5], and trophic effects on intestinal mucosa [6]. Thus, cell mass production of

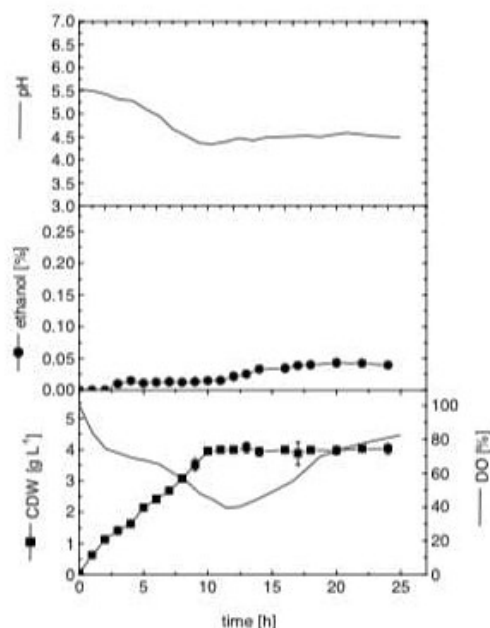


Fig. 8: Kinetic of cell growth, ethanol production and change in dissolve oxygen and pH during batch cultivation of *S. boulardii* in 16-L stirred tank bioreactor under uncontrolled pH condition

Table 3: Medium compositions for *S. boulardii* biomass production before and after medium optimization

Medium components	Initial medium (g L ⁻¹)	Optimized medium (g L ⁻¹)
Glucose	60.0	20.0
Corn steep liquor	15.0	15.0
Sodium nitrate	7.0	1.0
Other medium components in both media in (g L ⁻¹): KH ₂ PO ₄ , 6.0; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 3.0; CuSO ₄ ·5H ₂ O, 0.002; FeSO ₄ ·7H ₂ O, 0.001; ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 0.01 pH 5.5		

Table 4: Summary of growth kinetics parameters in both cultivation in Erlenmeyer flask and bioreactor scale under different cultivation conditions

Parameters	Shake Flask		Bioreactor 16-L	
	Initial medium	Optimized medium	Uncontrolled pH	Controlled pH
X _{max} (g L ⁻¹)	3.28	3.93	4.00	8.20
Specific growth rate, μ _{max} (h ⁻¹)	0.14	0.16	0.14	0.18
Ethanol _{max} (%)	0.200	0.075	0.050	0.025
Final pH	4.22	4.24	4.40	5.50

CONCLUSION

In the present work new industrial medium formula was developed for high cell mass production of biotherapeutic/probiotic yeast *S. boulardii*. The composition of medium before and after optimization was presented in Table 3. The optimized medium in this work was composed of (g L⁻¹): glucose, 20; corn steep liquor, 15; NaNO₃, 1.0; KH₂PO₄, 6.0; MgSO₄·7H₂O, 3.0; CuSO₄·5H₂O, 0.002; FeSO₄·7H₂O, 0.001; ZnSO₄·7H₂O, 0.01. Furthermore, cultivations were successfully carried out in pilot scale stirred tank reactor in batch culture to better high cell mass production. As shown in table 4 the highest cell mass of about 8.2 g L⁻¹ was achieved after 16 hours when cells cultivated in pH stat culture of 5.5 (this value was almost double of those obtained in uncontrolled pH bioreactor



VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology

Journal homepage: <https://js.vnu.edu.vn/NST>

Original Article

Culture Condition for High Biomass Production of Probiotic Yeast *Saccharomyces Boulardii* SB2 in Shake Flask and 30 Litre Scale

Dao Thi Luong*, Ha Thi Hang, Duong Van Hop

VNU Institute of Microbiology and Biotechnology, 144 Xuan Thuy, Hanoi, Vietnam

Received 25 March 2019

Revised 09 April 2019; Accepted 21 July 2019

Abstract: Probiotic properties *in vitro* of the *Saccharomyces boulardii* SB2 yeast, was isolated from fruit at Cuc Phuong National Park were evaluated based on biological characteristics and tolerance in simulated intestinal conditions. In the present work, studies were carried out to improve cell growth kinetics to produce cell mass of this biotherapeutic yeast in shake flask and 30-L bioreactor levels. In case of shake flask, the highest biomass was obtained under the culture conditions as **YM medium**, at **37°C**, **pH 6**, inoculum concentration of 5 %, with shaking for **32 h**; the best sources of carbon and nitrogen were found to be **glucose and mixture of peptone, yeast extract, malt extract**; cell dry weight and cell density reached 2.43 g L^{-1} and 10^9 CFU/ml repetitively. During 30-L bioreactor cultivation, the maximal cell mass in agitation speed of 200 rpm, aeration rate of $1.2 \text{ v v}^{-1} \text{ min}^{-1}$; at 32 h of incubation, was **3.58 g L^{-1}** in pH controlled culture and 3.08 g L^{-1} in uncontrolled pH. This is considered as the first step for cell mass production of this probiotic yeast in industrial scale

Keywords: *Saccharomyces boulardii* SB2, probiotic, biomass, shake flask, 30-L bioreactor.

* Corresponding author.

Email address: luongdt@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4879>



Biblioteca Central "Vicerrector Ricardo A. Podestá"
Repositorio Institucional

The production of yeast cell wall using an agroindustrial waste influences the wall thickness and is implicated on the aflatoxin B1 adsorption process

Año
2018

Autor
Pereyra, C.M.; Gil S.; Cristofolini A.; Bonci M.; Makita M.; Monge M.; Montenegro M.A. y Cavaglieri L.R.

Este documento está disponible para su consulta y descarga en el portal on line de la Biblioteca Central "Vicerrector Ricardo Alberto Podestá", en el Repositorio Institucional de la **Universidad Nacional de Villa María**.

CITA SUGERIDA

Pereyra, C.M.; [et al.] (2018). *The production of yeast cell wall using an agroindustrial waste influences the wall thickness and is implicated on the aflatoxin B1 adsorption process*. Food Research International, 111, 18 p.



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional

2.1. Yeast strain and growth conditions

The strains used in this study belong to the genus *Saccharomyces*. Three strains *S. boulardii* RC009, *S. cerevisiae* RC012 and *S. cerevisiae* VM014 with demonstrated probiotic properties were used. Strains were molecularly identified and deposited in National University of Rio Cuarto, Cordoba, Argentina (RC) collection centre (Armando et al., 2011; Díaz-Vergara et al., 2017). The obtained sequences have been deposited in GenBank under accession numbers MH266045, MH266046 and MH266047 (see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

The colony grown on malt extract agar (MEA) was inoculated into a tube with yeast extract-peptone-dextrose broth (YPD) and incubated at 30 °C for 12 h to be a pre-inoculum. From this pre-inoculum, a cell suspension (1×10^7 cells mL⁻¹) was performed and each strain was inoculated into 100 mL of YPD broth (as a control culture medium) and 100 mL of broth based on DDGse and incubated at 30 °C for 24 h with shaking (150 rpm).

2.2. Preparation of the dry distillery grain soluble extract

The DDGs were obtained from a local bio-ethanol producing plant. The DDGse was prepared by adding water (300 mL + 75 g DDGs) to obtain a 25% DDGse that was left at fluent steam for 20 min and then filtered. To 100 mL of the filtered extract, 1 g of yeast extract and 0.1 g of potassium phosphate was added. The DDGse was then autoclaved at 121 °C, 1 atm for 15 min.

The estimation of reducing sugars from the DDGse medium was determined using the dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller, 1959). Seventy five (75 g) of NaK tartrate and 4 g of NaOH were weighed. The NaOH was dissolved in 200 mL of distilled water and the NaK tartrate was added slowly under stirring. 3.5 DNS acid (0.25 g) was added slowly to a volumetric flask and filled with distilled water to 250 mL.

One-hundred µL of the sample with 1 mL of the DNS reagent were mixed and incubated in a water bath at 100 °C for 10 min. The tubes were cooled and measured in a spectrophotometer at 570 nm. The calibration curve was made using different glucose concentrations (0.004, 0.4, 0.8 and 4 g.L⁻¹). All samples were analyzed in duplicate.

Table 1
Biomass and cell wall production (g L⁻¹) of *Saccharomyces boulardii* RC009, *S. cerevisiae* RC012 and *S. cerevisiae* VM014 obtained from two different culture media.

Yeast strains	Culture media	Biomass production (g L ⁻¹)	Cell wall production (g L ⁻¹)	(%)
<i>S. boulardii</i> (RC009)	YPD	4.02	1.19	29.6
	DDGse	3.15	0.22	6.98
<i>S. cerevisiae</i> (RC012)	YPD	5.00	1.85	37
	DDGse	4.02	0.65	16.2
<i>S. cerevisiae</i> (VM014)	YPD	4.89	0.108	2.22
	DDGse	3.69	0.761	20.6



Змінити тип шляху

Варіант

Масштаб: 100%

Пошук

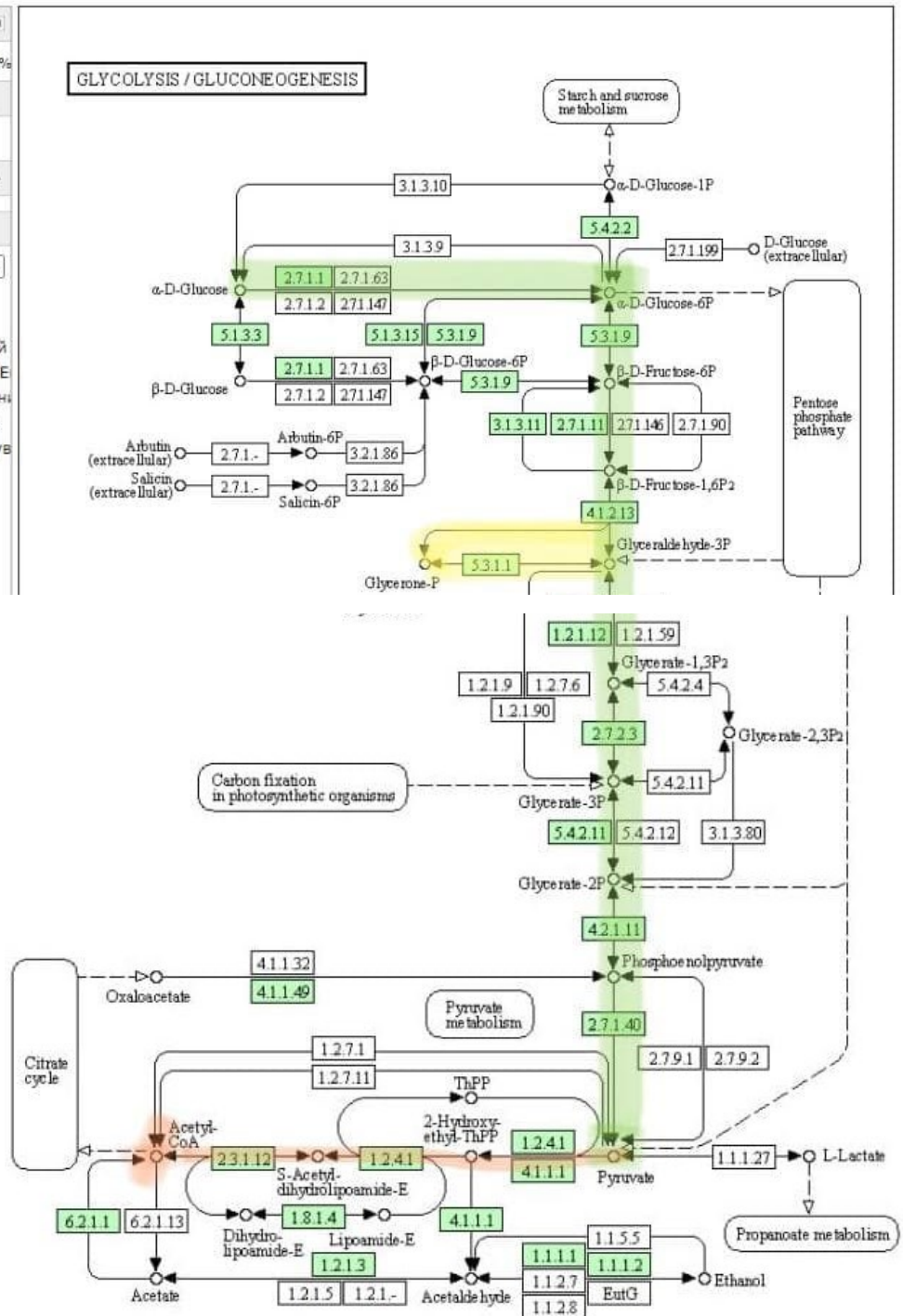
Дані користувача

Модуль

Тільки заповнити

Модулі шляху

- ☐ Обмін вуглеводів
- ☐ Центральний вуглеводний
- ☐ M00001 Гліколіз (шлях E
- ☐ M00002 Гліколіз, основн
- ☐ M00003 Глюконеогенез
- ☐ M00307 Окислення пірув

00010 5/7/20
(c) Kanehisa Laboratories