МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) __біотехнології та екологічного контролю__
Кафедра _____біотехнології і мікробіології_____

«До захисту в ЕК»	**«До захисту допущено»**
Декан факультету	Завідувач кафедри
_____ _Наталія ГРЕГІРЧАК_	_____ _Віктор СТАБНІКОВ_
(підпис) (ім'я та прізвище)	(підпис) (ім'я та прізвище)
«___» ____червня_____ 2024 р.	«___» ___червня_____ 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності _____162 «Біотехнології та біоінженерія»_____
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми____«Біотехнології: фармацевтична,_____
_____промислова, харчова, природоохоронна»__
на тему: _Одержання біомаси *Bifidobacterium bifidum* як компонента пробіотика Біфікол

Виконав: здобувач__IV__ курсу, групи__2___

_____БЕРЕЖНА Анна Сергіївна_____ _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник _СТАРОВОЙТОВА Світлана Олександрівна _____
(прізвище , ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти_____ _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

_____ _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент _Максим ТАНАНА_ _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач_____
(підпис)

Київ – 2024 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 __«Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»_____
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри _біотехнології і мікробіології_____
_____Віктор СТАБНІКОВ_
"_01_" __березня__2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

_____БЕРЕЖНОЇ Анни Сергіївни_____
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи __«Одержання біомаси *Bifidobacterium bifidum* як компонента пробіотика Біфікол»_____
_____
керівник роботи _СТАРОВОЙТОВА Світлана Олександрівна доц., канд.б. наук,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти від 29 березня 2024 року № 238-кс
2. Строк подання здобувачем роботи __28 травня 2024 р._____
3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Bifidobacterium bifidum*, цільовий продукт: пробіотик Біфікол_____
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)__РОЗДІЛ 1. Характеристика пробіотика Біфікол. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика *Bifidobacterium bifidum*. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез Біфіколу. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 9. Основні післяферментаційні процеси. РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля._____
5. Перелік графічного матеріалу
_Технологічна схема виробництва пробіотика «Біфікол» - 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробництва пробіотика «Біфікол» - 1 аркуш формату А1._____

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання___01.03.2024 р._____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика пробіотика Біфікол	01.03.24 – 10.03.24	
2	Обґрунтування вибору та характеристика *Bifidobacterium bifidum*	11.03.24 – 17.03.24	
3	Техніко-економічне обґрунтування	18.03.24 – 24.03.24	
4	Біосинтез Біфіколу	25.03.24 – 31.03.24	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	01.04.24 – 07.04.24	
6	Специфікація обладнання	08.04.24 – 14.04.24	
7	Опис технологічної схеми	15.04.24 – 21.04.24	
8	Контроль виробництва	22.04.24 – 28.04.24	
9	Основні післяферментаційні процеси	29.04.24 – 05.05.24	
10	Охорона довкілля	06.05.24 – 12.05.24	
11	Оформлення пояснювальної записки	13.05.24 – 19.05.24	
12	Виконання графічної частини проекту	20.05.24 – 28.05.24	

Здобувач _____ _____Анна БЕРЕЖНА_____
(підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____ ___Світлана СТАРОВОЙТОВА____
(підпис) (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схеми біосинтезу біомаси *Bifidobacterium bifidum* як компонента пробіотика Біфікол, який за оптимальних умов росту на недорогому у порівнянні поживному середовищі синтезує $5{,}0\times10^{11}$ КУО/мл живих клітин за 24 год. Розрахована потужність виробництва пробіотика Біфікол становить 440 кг/рік.

Технологічний процес складається з допоміжних робіт (підготовка інертного газу, приготування і стерилізація титрувальних агентів та поживних середовищ) та основних робіт (вирощування інокуляту у колбах та інокуляторах об'ємом 10 л та 100 л, виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 1 $м^3$ з коефіцієнтом заповнення 0,8). Розроблено карту постадійного контролю доферментаційних процесів і виробничого біосинтезу, схему післяферментаційних етапів одержання препартату, зазначено методики контролю концентрації цільового продукту, вуглецю та амінного азоту.

Кваліфікаційна робота викладена на 118 сторінок , містить 16 таблиць, 5 рисунків. Складається зі вступу, десяти розділів, списку використаної літератури, технологічної (формат А1) та апаратурної (формат А1) схем.

Ключові слова: *Bifidobacterium bifidum*, пробіотик, Біфікол, біосинтез, поживне середовище.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of the technological and equipment scheme for the biosynthesis of *Bifidobacterium bifidum* biomass as a component of the Bificol probiotic, which, under optimal growth conditions on a relatively inexpensive nutrient medium, synthesizes $5{,}0\times10^{11}$ CFU/ml of live cells within 24 hours. The calculated production capacity of the Bificol probiotic is 440 kg/year.

The technological process consists of auxiliary tasks (preparation of inert gas, preparation and sterilization of titration agents and nutrient media) and main tasks (cultivation of inoculum in flasks and inoculators with volumes of 10 liters and 100 liters, production biosynthesis is carried out in a fermenter with a volume of 1 m^3 with a filling coefficient of 0,8). A step-by-step control chart for pre-fermentation processes and production biosynthesis, a scheme of post-fermentation stages for obtaining the preparation, and methods for controlling the concentration of the target product, carbon, and amino nitrogen have been developed.

The qualification work consists of 118 pages, includes 16 tables, 5 figures. It comprises an introduction, ten chapters, a list of references, and technological (A1 format) and equipment (A1 format) schemes.

Keywords: *Bifidobacterium bifidum*, probiotic, Bificol, biosynthesis, nutrient medium.

ЗМІСТ

ВСТУП.....8

РОЗДІЛ 1. Характеристика пробіотика Біфікол.....10

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика *Bifidobacterium bifidum*.....16

2.1. Обґрунтування вибору *Bifidobacterium bifidum* та поживного середовища для його культивування.....16

2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....25

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Bifidobacterium bifidum* 25

2.4. Таксономічний статус *Bifidobacterium bifidum*.....27

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....28

3.1. Потреба у пробіотику Біфікол.....28

3.2. Розрахунок потужності виробництва.....31

3.3. Розрахунок об’єму ферментера та кількості виробничих циклів.....37

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....38

РОЗДІЛ 4. Біосинтез Біфіколу.....42

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у *Bifidobacterium bifidum*.....42

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у пробіотик Біфікол.....44

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....48

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....48

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....50

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....51

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....58

РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....62

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.....67

РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва.....79

8.1. Карта постадійного контролю 79

8.2. Мікробіологічний контроль.....86

8.3. Показники росту і синтезу біомаси *Bifidobacterium bifidum*.....88

8.4. Показники якості пробіотика Біфікол.....90

РОЗДІЛ 9. Основні післяферментаційні процеси.....97

РОЗДІЛ 10 Охорона довкілля.....105

10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва пробіотика Біфікол на місцях утворення твердих, рідких та газоподібних відходів.....105

10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....106

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....110

ДОДАТОК.....118

ВСТУП

Термін «пробіотик» широко використовується вже понад 60 років. Його визначення уточнювалося в ході накопичення експериментальних даних. [56]

У 2003 р. канадський професор мікробіології та імунології Грегор Рейд запропоновав визначення: пробіотики – це живі мікроорганізми, застосування яких у адекватних дозах сприяє поліпшенню здоров'я хазяїна.[56]

На теперішній час згідно з визначенням ВООЗ (WHO, 2009 р.) пробіотики – апатогенні для людини бактерії, які мають антагоністичну активність щодо патогенних і умовно-патогенних бактерій та забезпечують відновлення нормальної мікрофлори. [59] Найбільш часто в якості пробіотичних штамів використовують біфідобактерії і молочнокислі бактерії. Ці мікроорганізми мають високу здатність до колонізації епітелію, що служить захисним бар'єром на шляху проникнення патогенної мікрофлори і забезпечує стабілізацію нормального складу мікробіоценозу за рахунок закислення середовища та синтезу антибіотичних речовин. [59]

Пробіотики безпечні, дешеві та здатні боротися з мікробними інфекціями, тому Всесвітня організація охорони здоров'я визнає їх вторинною імунною системою. [10]

Захворювання такі як діарея, запор, синдром подразненого кишечника, синдром запалення кишечника, астма, атопічний дерматит, виразкова хвороба, рак товстої кишки, ішемічна хвороба серця та інфекції сечовивідних шляхів належать до шлунково-кишкових і нешлунково-кишкових захворювань, для лікування яких пробіотики стали перспективним джерелом медичної терапії.[10]

Мета кваліфікаційної роботи – проєктування ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу (технологічна та апаратурна схеми) біомаси *Bifidobacterium bifidum* як компонента пробіотика Біфікол.

Новизна роботи: український ринок пробіотиків має невелику кількість відчизняних виробників пробіотиків, оскільки більшість ринку становлять закордонні виробники, тому основне питання яке потрібно вирішити, це забепечення відчизняного ринку пробіотиками та зменшення захворюваності на шлунково кишкові хвороби.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІФІКОЛУ

Біфікол - антидіарейний мікробний препарат, до складу якого входять живі ліофілізовані штами біфідобактерій (*Bifidobacterium bifidum № 1*) і живі ліофілізовані штами кишкової палички (*Escherichia coli M 17*). [27]

Bifidobacterium bifidum – нерухомі грампозитивні поліморфні палички, мають біфуркацію на одному або двох кінцях, довжина 4-5 мкм, розміщуються у вигляді скупчень або окремих клітин. По відношенню до кисню – облігатний анаероб. Оптимальна температура для росту 37ºС.

Здійснює адгезію до епітелію, зброджує глікоген з утворенням коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК), синтезує антимікробні метаболіти, стимулює місцевий імунітет, нешкідлива для організму господаря, здійснює пригнічення росту патогенних культур мікроорганізмів. *Bifidobacterium bifidum* здійснює протидіарейний ефект тому, що вона є антагоністом широкого спектру патогенних (*Shigella, Salmonella, Staphylococcus aureus* тощо) та умовно-патогенних організмів (*Proteus, Klebsiella* та ін.). [62]

Escherichia coli – дрібні грамнегативні палички (0,5*2,0 мкм), аспорогенні, переважно рухливі, властивий широкий спектр ферментативної активності.

Кишкові пилички в організмі людини виконують такі важливі функції: сприяють гідролізу лактози, буруть участь у продукуванні вітамінів групи В, К, фолієвої кислоти тощо. Виробляють бактеріоцини та мікроцини з відповідно високою та низькою молекулярною масою, що пригнічують ріст патогенних шигел, сальмонел, ентеропатогенних кишкових паличок та умовно патогенних мікроорганізмів різних таксономічних груп. Клітинна стінка

кишкових паличок містить ліпополісахарид, що стимулює синтез лізоциму, С3 -фрагменту комплементу, прозапальних та протизапальних цитокінів, забезпечуючи міцну імуномодулювальну дію за рахунок активації гуморального та клітинного вродженого імунітету. [62]

Діюча речовина: одна доза препарату (порошок) містить не менше $1 \cdot 10^7$ КУО біфідобактерій і не менше $1 \cdot 10^7$ КУО кишкової палички.

Допоміжні речовини: сахароза або цукор дрібнокристалічний, желатин, молоко нежирне або згущене нежирне стерилізоване.

Лікарська форма: порошок для оральних розчинів. [27]

Рис 1.1 Приклад лікарської форми Біфіколу [26]

Фармакотерапевтична група: Антидіарейні мікробні препарати. Код АТС A07F A. [27]

Фізико-хімічні властивості: порошок (кристалічна або пориста маса) різних відтінків коричневого кольору зі специфічним запахом і смаком. При додаванні води утворюється гомогенна суспензія з різними відтінками коричневого кольору (можлива наявність дрібних пластівців). [27]

Механізм дії: Біфікол є багатофакторним лікувальним засобом, який має антагоністичну активність по відношенню до ряду патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Здійснює коригуючий вплив на бактеріоценоз, стимулює місцеві репаративні процеси у кишечнику; запобігає розвитку мікроорганізмів, які спричиняють процеси гниття у кишечнику, підтримує рівновагу нормальної мікрофлори, зменшує метеоризм, нормалізує процеси травлення та всмоктування у кишечнику, сприяє покращенню місцевого імунітету та опірності організму. [27]

Показання: Біфікол застосовувати для лікування дорослих і дітей (починаючи з 6-місячного віку), що мають порушення біоценозу кишечнику різної етіології. [27]

Протипоказання: Гіперчутливість до складових речовин препарату.

Взаємодія з іншими лікарськими засобами та інші види взаємодій: Терапевтичний ефект від прийому препарату деякою мірою знижується при одночасному застосуванні антибіотиків.

Прийом вітамінів, особливо групи В, посилює дію препарату.

Особливості застосування: Препарат краще призначати після курсу антибіотикотерапії. При тяжкому перебігу основного захворювання, коли неможливо переривати курс антибіотикотерапії, препарат призначати одночасно з антибіотиками або іншими засобами направленої дії. Пацієнтам, у яких встановлена непереносимість деяких цукрів або лактози необхідно проконсультуватися з лікарем щодо застосування препарату. Неприпустиме розчинення препарату гарячою водою (40 ºС та вище) та зберігання його у розчиненому стані. [27]

Застосування у період вагітності або годування груддю: Не встановлено протипоказань до застосування препарату у період вагітності або годування груддю. [27]

Спосіб застосування та дози:

Біфікол застосовувати внутрішньо у вигляді розчину (гомогенної завісі), який слід готувати безпосередньо перед використанням. Для розчинення препарату застосовувати кип'ячену воду кімнатної температури (20-25 °С). [27]

Спосіб розчинення:

1. У склянку налити воду, 1 чайна ложка на 1 дозу препарату (кількість доз вказано на етикетці);

2. Для розчинення препарату частину води (1-2 чайні ложки) зі склянки перелити у флакон і збовтати. Препарат розчиняється не більше 5 хвилин;

3. Розчинений препарат з флакону перелити до склянки з залишком води і ретельно перемішати.1 чайна ложка отриманого у склянці розчину становить 1 дозу препарату. Необхідну кількість чайних ложок розчину (доз препарату) випивати за 20-30 хв до прийому їжі.

Добові дози препарату для дорослих і дітей становлять:

- дітям віком від 6-ти місяців до 1 року - 2-3 дози (2-3 чайні ложки);

- дітям віком від 1 року до 3-х років - 3-5 доз (3-5 чайних ложок);

- дітям віком від 3-х до 5-ти років - 5-6 доз (5-6 чайних ложок);

- дітям віком від 5-ти до 10-ти років - 6-8 доз (6-8 чайних ложок);

- дітям віком від 10-ти років - 8-10 доз (8-10 чайних ложок);

- дорослим - 10-15 доз (10-15 чайних ложок).

Добову дозу препарату ділити на 2-3 прийоми. Тривалість курсу лікування Біфіколом® залежить від тяжкості та тривалості захворювання, віку пацієнта, вираженості дисбактеріозу. Зазвичай лікування становить від 2-х до 5-ти тижнів, а в окремих випадках - до 2-х місяців і більше.

Для закріплення отриманого клінічного ефекту або у випадку неповної нормалізації мікрофлори через 10-14 днів після закінчення першого курсу лікування можна призначити підтримуючий курс. При цьому препарат застосовувати у половинній разовій та добовій дозі. [27]

Діти: Дітям віком до 6-ти місяців препарат не застосовувати.

Передозування: Не встановлено.

Побічні реакції: Застосування Біфіколу®, як правило, не спричиняє побічних реакцій. Іноді можлива поява легких диспепсичних розладів, що проходять самостійно і не потребують відміни препарату та надання допомоги. Рідко можлива більш виражена реакція, тоді прийом препарату доцільно призупинити. Якщо після поновлення лікування препаратом виражена реакція повторюється, прийом препарату слід припинити. Можливе виникнення реакцій гіперчутливості. [27]

Термін придатності: 1 рік.

Умови зберігання: Зберігати у сухому, захищеному від світла місці при температурі від 2 до 8 ºС, у недоступному для дітей місці.

Упаковка: По 2 або 3, або 5 доз у флаконі. По 10 флаконів у пачці.

Категорія відпуску: Без рецепта.

Виробник: ПрАТ «БІОФАРМА». [27]

Ідентифікація:

Bifidobacterium bifidum – нерухомі, грампозитивні, поліморфні палички, мають біфуркацію на одному або двох кінцях, довжина 4-5 мкм, розміщуються у вигляді скупчень або окремих клітин. По відношенню до кисню – облігатний анаероб. На напіврідких середовищах колонії біфідобактерій мають форму дрібних «цвяхів», «крихток», «ниток» білого кольору.[47]

Escherichia coli - дрібні грамнегативні палички (0,5*2,0 мкм), аспорогенні, переважно рухливі, властивий широкий спектр ферментативної активності. [62] На агаризованих середовищах утворюють плоскі опуклі каламутні з рівними або трошки хвилястими краями колонії або сухі плоскі колонії з нерівними краями. У рідких середовищах ростуть рівномірно, що призводить до помутніння середовища і утворення осаду. На середовищі Ендо формуються колонії малинового кольору з металевим блиском або без нього. На середовищі ЕМС (Левіна) вони мають темно-фіолетовий колір з металевим блиском або без нього. На середовищі Плоскірєва вони є червоними з жовтим відтінком. [42]

Специфічна активність: Специфічна активність пробіотика визначається за кількістю життєздатних клітин *Bifidobacterium bifidum* та *Escherichia coli* в одній дозі Біфіколу та активністю кислотоутворення. В одній дозі пробіотика повинно міститися не менше 10^7 життєздатних клітин *Bifidobacterium bifidum* та не менше 10^7 життєздатних клітин *Escherichia coli*. Показник активності кислотоутворення Біфіколу повинен становити не менше 90 °Т. [62]

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика *Bifidobacterium bifidum*

2.1. Обґрунтування вибору *Bifidobacterium bifidum* та поживного середовища для його культивування

Пробіотики – живі мікроорганізми та речовини мікробного походження, які зумовлюють позитивні ефекти на фізіологічні , біохімічні та імунні реакції організму хазяїна (людини або тварини) внаслідок оптимізації та стабілізації його мікробіоти. [62]

Роди *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* є найбільш широко використовуваними пробіотиками, і різні їх види входять до складу більшості пробіотичних продуктів. [5]

Bifidobacterium належать до типу *Actinobacteria*, оскільки вони мають характерну розгалужену морфологію. Найбільш поширеними видами пробіотиків *Bifidobacterium* є *B. animalis, B. bifidum, B. breve, B. infantis, B. lactis, B. longum*. [14]

Bifidobacterium bifidum — це вид біфідобактерій із високою поширеністю в мікробіомі кишківника людини. Це один з найперших видів бактерій, які колонізують кишковий тракт новонароджених. Корисні ефекти *B.bifidum* включають відновлення пошкодженої слизової оболонки кишечника, модулюючи збурення та метаболічний профіль кишечника, пригнічуючи коліт, знижуючи рівень холестерину та полегшуючи порушення просторової пам'яті. *B. bifidum* має потужні пробіотичні функції та потенціал для запобігання або лікування ряду захворювань людини. В даний час він доступний як функціональний харчовий інгредієнт. [11]

Узагальнені дані щодо порівняльної характеристики продуцентів наведено в табл. 2.1.1. Найбільшу кількість живих клітин ($5{,}0\times10^{11}$ КУО/мл) утворює *Bifidobacterium bifidum 1* [45], у той час як *Bifidobacterium bifidum BGN4* – $3{,}0\times10^{9}$ КУО/мл [7]. Найменшу кількість утворює *Bifidobacterium longum CCRC 14634* ($1{,}3\times10^{9}$ КУО/мл) [1].

Для виробництва біомаси *B. bifidum* рекомендовані стратегії періодичного підживлення з високою щільністю клітин і стратегії контролю pH [12]

Таблиця 2.1.1

Порівняльна характеристика продуцентів

Біологічний агент	**Склад поживного середовища:**		**Тривалість культивування, год**	**Концентрація живих клітин, КУО/мл**	**Особливості процесу біосинтезу**	**Література**
	компонент	**концентрація, г/л**				
Bifidobacterium bifidum BGN4	Сахароза соєвий пептон екстракт яловичини дріжджовий екстракт фосфат натрію одноосновний фосфат натрію двоосновний цитрат амонію малеїнова кислота сульфат марганцю, сульфат заліза L-цистеїну Твін 80	50 10 10 20 10 5 2 0,1 0,05 0,1 0,5 1	25	$3{,}0 \times 10^9$	t=37°C pH=6,0, титрант – NH_4OH, 200 об/хв барботували газовою сумішшю(90% N2, 5% CO2 і 5% H2) при 0,02 vvm для підтримки анаеробних умов.	High Concentration Cultivation of Bifidobacterium bifidum in a Submerged Membrane Bioreactor / S. G. Kwon et al. *Biotechnology Progress*. 2006. Vol. 22, no. 6. P. 1591–1597. URL: https://doi.org/10.1021/bp060236s

Продовження таблиці 2.1.2

Bifidobacterium bifidum 1	Соєва сироватка Лактоза Пептон Аскорбінова кислота Натрій лимоннокислий тризаміщений Калій фосфорнокислий двозаміщенийKH2PO4 Магній сірчанокислийMgSO4 Агар-агар	50 1 1 0,5 6 2 1,2 2,5	24	$5,0\times10^{11}$	t=37°C pH=6,8 – 7,0 титрант – NaOH	Патент № 107738. Композиція інгредієнтів для культивування бактерій роду Bifidobacterium // Крупицька Л. О, Капрельянц Л. В, Труфкаті Л В.

Закінчення таблиці 2.1.2

Bifidobacterium longum CCRC 14634	пептон дріжджовий екстракт екстракт яловичини декстроза полісорбат 80 цитрат амонію ацетат натрію сульфат магнію сульфат марганцю дикалій фосфат L-цистеїн	10 5 10 20 1 2 5 0,1 0,05 2 0,5	24	$1{,}3 \cdot 10^9$	37° C, pH контролювали на рівні 6,0 за допомогою NaOH.	A repeated batch process for cultivation of Bifidobacterium longum / S. L. Her et al. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2004. Vol. 31, no. 9. P. 427–432. URL: https://doi.org/10.1007/s10295-004-0164-3

Щоб повноцінно порівняти біологічні агенти здійснюється прорахунок вартості поживного середовища для кожного мікроорганізму.

Розрахунок представлено в таблиці 2.1.2.

Таблиця 2.1.2.

Визначення вартості поживних середовищ

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації*
Bifidobacterium bifidum BGN4	Сахароза	50	90	4,5	1
	соєвий пептон	10	1320	13,2	2
	екстракт яловичини	10	5020	50,2	3
	дріжджовий екстракт	20	4019,9	80,4	4
	фосфат натрію	10	100	1	5
	одноосновний фосфат натрію	5	126	0,63	6
	двоосновний цитрат амонію	2	517	1,034	7
	малеїнова кислота	0,1	250	0,025	8
	сульфат марганцю	0,05	57,60	0,00288	9
	сульфат заліза	0,1	30	0,003	10
	цистеїн	0,5	876	0,438	11

Продовження таблиці 2.1.2

	Полісорбат 80	1	162	0,162	16
	Вартість 1 л середовища ≈ **151,59**				
Bifidobacterium bifidum 1	Соєва сироватка	50	30	1,5	21
	Лактоза	1	78	0,078	20
	Пептон	1	1320	1,32	2
	Аскорбінова кслота	0,5	487	0,2435	19
	Натрій лимоннокислийтри заміщений	6	156	0,936	17
	Калій фосфорнокислий двозаміщений	2	150	0,3	15
	Магній сірчанокислий	1,2	55	0,066	13
	Агар-агар	2,5	217	0,5425	18
	Вартість 1 л середовища ≈ **4,99**				
Bifidobacterium longum CCRC 14634	пептон	10	1320	13,2	2
	дріжджовий екстракт	5	4019,9	20,1	4
	екстракт яловичини	10	5020	50,2	3
	декстроза	20	118	2,36	12
	полісорбат 80	1	162	0,162	16
	цитрат амонію	2	517	1,034	7
	ацетат натрію	5	170	0,85	14

Закінчення таблиці 2.1.2

	$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,1	55	0,0055	13
	$MnSO4 \times 7H_2O$	0,05	57,60	0,00288	9
	K_2HPO_4	2	150	0,3	15
	цистеїн	0,5	876	0,438	11
	Вартість 1 л середовища ≈ **88,65**				

Примітка* (вартість компонентів наведено станом на березень 2023): 1 - https://www.covalent.com.ua/shop/sucrose/ , 2 - https://www.systopt.com.ua/ru/item-pepton-fermentatyvnyj , 3 - https://labstar.com.ua/ru/pitatelnie_sredy/psr-3, 4 - https://shop.hlr.ua/ua/drojjevoy-ekstrakt-500-g-conda-144107.html, 5 - https://prom.ua/ua/p611311417-trinatrijfosfat-fosfat-natriya.html , 6 - https://www.systopt.com.ua/item-natrij-fosfornokyslyj-fosfat-natriyu-odnozamishhenyj-b-v , 7 - https://prom.ua/ua/p1677007477-amonij-limonnokislyj-klebrig.html?srsltid=AfAwrE6mVFOAjxzo07QzZBCYYZ97nv4GHkvn9sSNweTgTOAaq6VlsEoBODw , 8 - https://prom.ua/ua/p619258974-maleinovaya-kislotatsis-butendiovaya.html , 9 - https://www.systopt.com.ua/item-marganets-sirchanokyslyj-sulfat-margantsyu , 10 - https://www.systopt.com.ua/item-zalizo-sirchanokysle-7-vodne , 11 - https://prom.ua/p1260811918-tsistein.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_cpa_50_sport_i_otdykh&gclid=Cj0KCQjwlPWgBhDHARIsAH2xdNdK6JduAM-jx0bAxwPfZtNexMvQspywqbq10uznBUusCahlulZGBFEaAqgdEALw_wcB , 12 - https://prom.ua/ua/p1754193483-dekstroza-glyukoza.html , 13 - https://agrodolina.com.ua/p1651477036-magnij-sirchanokislij-1kg.html?source=merchant_center , 14 - https://bigl.ua/p1090618426-natrij-uksusnokislyj-atsetat?utm_source=gmc_shopping&utm_medium=cpa&utm_content=top_product&utm_campaign=pla_produkty_pitaniya_napitki&utm_term=%7Bkeyword%7D&gclid=Cj0KCQjwlPWgBhDHARIsAH2xdNeET53SzliHCKG6kLCSo8ZzkIadz1GR7vPNpkCyydFhJhuphOGqbbAaAuyVEALw_wcB , 15 - https://runainter.com/ua/p260995616-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html , 16 - https://snabhim.com.ua/polisorbat , 17 - https://www.systopt.com.ua/item-natrij-lymonnokyslyj-tsytrat-natriyu , 18 - https://shop.hlr.ua/agar-agar-tm-quotrokoquot-12793.html , 19 - https://prom.ua/ua/p1280772978-askorbinovaya-kislota.html , 20 - https://www.systopt.com.ua/item-laktoza?srsltid=AfAwrE66WhhPWVHXXSV-BYkGYjH3nG6tEQSQvSu2ekSoXPaA8iuhyCnFXsA , 21 – наведена інформація ціни за насіння сої https://prom.ua/ua/p1495726651-soya-domashnya-1kg.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_cpa_war_produkty_pitaniya&gclid=CjwKCAjwrpOiBhBVEiwA_473dOXRJ1j4VzATDXzZNPmldkxh29Fr6eD1OkrtwW-nuQohmQyWAQB1rxoCRE8QAvD_BwE

За одержаними розрахунками найдешевше середовище для культивування належить *Bifidobacterium bifidum 1*. Ціна на 1 л поживного бульйону становить 4,99 грн. Друге за вартістю середовище використовує *Bifidobacterium longum CCRC 14634*, ціна якого складає 88,65 грн. Найдорожче середовище використовує *Bifidobacterium bifidum BGN4*, його вартість складає 151,59 грн.

Дані таблиць 2.1.1 і 2.1.2 вказують, що найбільш економічно вигідним для культивування є штам *Bifidobacterium Bifidum 1*, з огляду на вартість поживного середовища, необхідного для отримання необхідної кількості біомаси та тривалість культивування.

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

Визначення критичних показників продуцентів

Таблиця 2.1.3.

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація біомаси г/л	Тривалість культивування, год	Кількість біомаси, утвореної за годину, г/л	Умовна вартість цільового продукту, грн/г
Bifidobacterium bifidum BGN4	151,59	6	25	0,24	25,3
Bifidobacterium bifidum 1	4,99	6	24	0,25	0,8
Bifidobacterium longum CCRC 14634	88,65	6	24	0,25	14,8

Отже, підсумувавши данні таблиці 2.1.3 *Bifidobacterium bifidum 1* є найкращим біологічним агентом. На це вказує просте та дешеве поживне середовище (4,99 грн/л), найнижча умовна вартість цільового продукту (0,8 грн/г) та вихід біомаси за годину (0,25 г/л).

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Проводити перевірочний розрахунок складу поживного середовища в даному випадку недоцільно, оскільки він обов'язковий лише для синтетичних і напівсинтетичних поживних середовищ. Середовище для культивування *Bifidobacterium bifidum* є складним та містить надлишкову кількість деяких компонентів, до того ж головним показником є вихід біомаси не в г/л, а в КУО/мл, що й визначає пробіотичну активність штаму.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Bifidobacterium bifidum*

2.3.1 Морфолого-культуральні ознаки *Bifidobacterium bifidum*

Bifidobacterium bifidum – грампозитивні, неспороутворюючі, нерухливі, некислотостійкі палички розміром 0,5–1,3 х 1,5–8 мкм різної або різного розгалуження, поодинокі або ланцюжки різного розташування (у зіркоподібних агрегатах або розташованих у формі «V» або «Y»).[61,13]

Клітинна стінка біфідобактерій має грампозитивну структуру, що складається з товстої пептидогліканової оболонки, що містить полісахариди, білки та тейхоєві кислоти. Амінокислотний склад основних тетрапептидів муреїну варіюється серед видів та/або штамів одного виду, що дозволяє їх диференціювати. Глюкоза і галактоза і рамноза міститься як компонент полісахаридів клітинної стінки *Bifidobacterium*, з якісними та кількісними відмінностями між видами, штамами та умовами зростання. [2]

На агаризованих поживних середовищах *Bifidobacterium bifidum* утворюють колонії невеликого розміру, діаметром 2-5 мм, з рівним краєм,

випуклі, плоскі, блискучі, непрозорі, білого або світло сірого кольору з більш темним центром. [30].

На рідких поживних середовищах спостерігається ріст у вигляді рівномірного помутніння чи випадіння осаду. Плівка не утворюється [20].

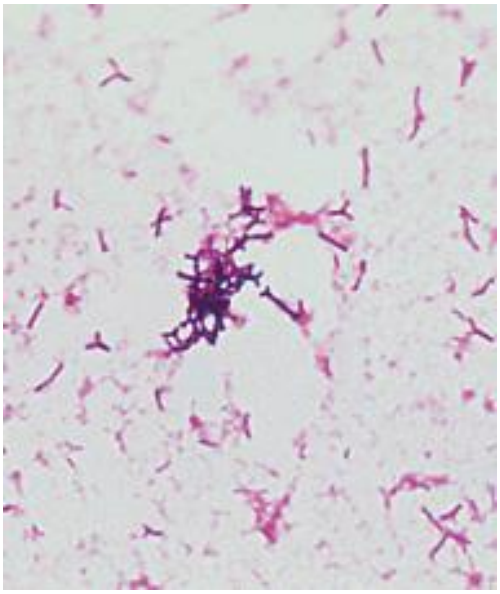

Рис.3.1. Колонії *Bifidobacterium bifidum*, пофарбовані за Грамом [3]

2.3.2 Фізіолого-біохімічні ознаки *Bifidobacterium bifidum*

Bifidobacterium bifidum – анаеробна бактерія. За температурним оптимумом – мезофіл, температура сприятлива для росту – 37-41 °С, при температурі нижче 20 °С і вище 46 °С ріст не відбувається. Оптимальний pH від 6,5 до 7,0. При pH нижче 4,5 і вище 8,5 ріст не відбувається. [2]

Хемоорганотрофи, зброджують вуглеводи з утворенням оцтової та молочної кислот, виділяють CO_2. [61]

Для оптимального росту біфідобактерії потребують відновників у культуральному середовищі (аскорбінової кислоти, тіогліколяту або цистеїну). Цистеїн - незамінна амінокислота для росту. Солі амонію служать джерелом азоту. Необхідними мікроелементами є залізо, магній і марганець. Потребують набору вітамінів групи В: В6 (піридоксин), В9 (фолієва кислота)

і B12 (ціанокобаламін) для оптимального росту, який також може бути забезпечений дріжджовим екстрактом. [8]

Більшість штамів *Bifidobacterium* використовують як джерела вуглецю глюкозу, галактозу, лактозу, лактулозу, олігосахариди, продукти гідролізу крохмалю, бікарбонати, вуглекислий газ. [8]

Стійкість до антибіотиків, таких як канаміцин, неоміцин, налідиксова кислота, поліміксин B, гентаміцин, стрептоміцин і метронідазол, ванкоміцин, фузидова кислота, триметроприм, норфлоксацин та колістин. Чутливість до ампіциліну, пеніциліну G, еритроміцину, цефалоспорину, бацитрацину, хлорамфенікла, кліндаміцину, нітрофурантоїну та тетрацикліну. [2]

2.4. Таксономічний статус *Bifidobacterium bifidum*

Bifidobacterium bifidum має наступний таксономічний статус [46]

Домен - *Bacteria*

Тип - *Firmicutes*

Клас - *Actimobacteria*

Порядок - *Bifidobacteriales*

Родина - *Bifidobacteriaceae*

Рід - *Bifidobacterium*

Вид - *bifidum*

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1. Потреба у пробіотику Біфікол

Найбільшу частину мікробіоти кишківника людини від народження займають бактерії роду *Bifidobacterium*. Біфідобактерії в організмі людини беруть участь у метаболічних процесах, а також у реалізації механізмів колонізаційної резистентності. [62]

Так як біфідобактерії в основному заселяють кишківник і забезпечуюють його функціональний стан, будемо розглядати статистику по захворюванням ШКТ.

За даними Державної служби статистики України за 2021 рік [57] 41,2 тисяч жителів України хворіли на гострі кишкові інфекції з них 31,7 тисяч – діти [67], хворих дорослих – 9,5 тисяч. Частка дітей становить 77%, відповідно дорослих – 23%.

Згідно інструкції [27] в одному флаконі препарату міститься 5 доз живої активної культури *Bifidobacterium bifidum* — не менше $1 \cdot 10^7$ КУО і *Escherichia coli* — не менше $1 \cdot 10^7$ КУО. Біфікол застосовувати внутрішньо у вигляді розчину (гомогенної завісі), який слід готувати безпосередньо перед використанням. Для розчинення препарату застосовувати кип'ячену воду кімнатної температури (20-25 °С). Необхідну кількість чайних ложок розчину (доз препарату) випивати за 20-30 хв до прийому їжі.

Добові дози препарату для дорослих і дітей становлять:

- дітям віком від 6-ти місяців до 1 року - 2-3 дози (2-3 чайні ложки);

- дітям віком від 1 року до 3-х років - 3-5 доз (3-5 чайних ложок);

- дітям віком від 3-х до 5-ти років - 5-6 доз (5-6 чайних ложок);

- дітям віком від 5-ти до 10-ти років - 6-8 доз (6-8 чайних ложок);
- дітям віком від 10-ти років - 8-10 доз (8-10 чайних ложок);
- дорослим - 10-15 доз (10-15 чайних ложок).

Тривалість курсу лікування Біфіколом залежить від тяжкості та тривалості захворювання, віку пацієнта, вираженості дисбактеріозу. Зазвичай лікування становить від 2-х до 5-ти тижнів, а в окремих випадках - до 2-х місяців і більше.

На упаковці та в інструкції не вказана вага п’яти доз препарату, за допомогою зважування встановлено, що вміст 5 доз важить 500 мг. Враховуючи, що в даному препараті міститься два штами мікрооргаізмів та допоміжні речовини: 10% сахарози та 3% желатини, то вміст потрібної нам культури становить 217,5 мг.

Потреба на курс лікування для дорослих :

Gдр = 15 дз * 0,2175 г * 35 дн * 9500 дт = 1 084 781, 25 г = 1 084,8 кг

Загальна потреба на курс для дітей :

Gдт = 3 дз * 0,2175 г * 35 дн * 31700 дт = 723 948, 75 г = 723,9 кг

Gдт = 5 дз * 0,2175 г * 35 дн * 31700 дт = 1 206 581,25 г = 1 206,6 кг

Gдт = 6 дз * 0,2175 г * 35 дн * 31700 дт = 1 447 897,5 г = 1 447,9 кг

Gдт = 8 дз * 0,2175 г * 35 дн * 31700 дт = 1 930 530 г = 1930,5 кг

Gдт = 10 дз *0,2175 г * 35 дн * 31700 дт = 2 413 162,5 г = 2 413,2 кг

∑Gдт = 7 722,1кг

Загальна потреба у Біфіколі складе

∑G = Gдр + Gдт = 1 084,8 + 7 722,1 = 8 806,9 кг

Таблиця 3.1

Розрахунок річної потреби у пробіотику Біфіколі

Категорії хворих	Доза препарату, г	Кількість прийомів на добу	Тривалість лікування, діб	Кількість хворих в Україні на 2021 рік, млн	Загальна кількість препарату, кг
1	2	3	4	5	6
дітям віком від 6-ти місяців до 1 року	0,2175	3	35	0,0317	7 722,1
дітям віком від 1 року до 3-х років	0,2175	5	35		
дітям віком від 3-х до 5-ти років	0,2175	6	35		
дітям віком від 5-ти до 10-ти років	0,2175	8	35		

Закінчення таблиці 3.1

дітям віком від 10-ти років	0,2175	10	35		
дорослим	0,2175	15	35	0,0095	1 084,8
Всього					8 806,9

3.2. Розрахунок потужності виробництва

В Україні станом на 2020 рік згідно з Державним реєстром лікарських засобів зарєєстровано 12 лікарських засобів (Ентерожерміна, Ентерожерміна форте, Ентерол, Йогурт, Лактовіт форте, Лацидофіл, Лінекс, Лінекс бебі, Лінекс форте, Нормагут, Мутафлор, Про-симбіофлор) з аналогічною терапевтичною дією, всі інші пробіотики зареєстровані як БаДи.

Український ринок пробіотичних лікарських засобів представлений сімома іноземними країнами-виробниками, такими як Німеччин, Словенія, Італія, Канада, Франція, Польща та Індія. [67]

Таблиця 3.2

Характеристика пробіотичних лікарських засобів

Країна-виробник	Препарат	Вид (штам)	Дозування, КУО	Форма випуску	Джерело
Італія	Ентерожерміна	*Bacillus clausii*	4×10^9	суспензія оральна, № 10; № 20 (10х2): по 5 мл у флаконі;	http://surl.li/ulkkt

Продовження таблиці 3.2

Італія	Ентерожерміна форте	*Bacillus clausii*	4×10^9	суспензія оральна № 5: по 5 мл у флаконі;	https://tabletki.ua/%D0%AD%D0%BD%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%BE%D0%B6%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%B8%D0%BD%D0%B0-%D1%84%D0%BE%D1%80%D1%82%D0%B5/33798/
Франція	Ентерол	*Saccharomyces boulardii*	не менше 2×10^9	капсули по 250 мг по 10 або по 20, або по 30, або по 50 капсул у пляшці скляній;	https://tabletki.ua/%D0%AD%D0%BD%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%BE%D0%BB/1060255/

Продовження таблиці 3.2

Канада	Йогурт	*Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus rhamnosus* *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*	2 млрд. Активних клітин	капсули	https://tabletki.ua/%D0%99%D0%BE%D0%B3%D1%83%D1%80%D1%82/21910/
Індія	Лактовіт форте	*Lactic Acid Bacillus (Bacillus coagulans (Lb. sporogenes))*	120 міліонів спор	капсули	https://tabletki.ua/%D0%9B%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D1%82-%D1%84%D0%BE%D1%80%D1%82%D0%B5/31051/

Продовження таблиці 3.2

Польща	Лацидофіл	*Lactobacillus rhamnosus*	не менше 2×10^9 КУО	капсули	https://tabletki.ua/%D0%9B%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%B4%D0%BE%D1%84%D0%B8%D0%BB/24346/
		Lactobacillus helveticus			
Словенія	Лінекс	*Lactobacillus acidophilus*	не менше $4,5 \times 10^6$	капсули тверді, по 32 капсули у флаконі;	https://tabletki.ua/%D0%9B%D0%B8%D0%BD%D0%B5%D0%BA%D1%81/22217/
		Bifidobacterium infantis	не менше $3,0 \times 10^6$		
		Enterococcus faecium	не менше $4,5 \times 10^6$		
Словенія	Лінекс бебі	*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*	1 000 000 000 КУО	порошок для оральної суспензії,	http://surl.li/ulknm

Продовження таблиці 3.2

Словенія	Лінекс форте	*Lactobacillus acidophilus*	Не менше1×10^9	капсули тверді; по 7 капсул у блістері	https://tabletki.ua/%D0%9B%D0%B8%D0%BD%D0%B5%D0%BA%D1%81-%D1%84%D0%BE%D1%80%D1%82%D0%B5/29076/#%D0%9F%D1%80%D0%BE%D0%B8%D0%B7%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D1%82%D0%B5%D0%BB%D1%8C
		Bifidobacterium animalis subsp. lactis	не менше 1×10^9 КУО		

Продовження таблиці 3.2

Німеччина	Мутафлор	*Escherichia coli NISSLE 1917*	1 мл суспензії містить 10^8 КУО	суспензія оральна	https://tabletki.ua/%D0%9C%D1%83%D1%82%D0%B0%D1%84%D0%BB%D0%BE%D1%80/9996/
	Нормагут	*Saccharomyces boulardii*	Мінімум 10^{10}	капсули по 10 капсул у блістері;	https://tabletki.ua/%D0%9D%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B0%D0%B3%D1%83%D1%82/29857/

Закінчення таблиці 3.2

Німеччина	Про-симбіофлор	*Escherichia coli*	1,5-4,5 х 10^7	краплі оральні, суспензія по 50 мл у флаконах	https://tabletki.ua/%d0%9f%d1%80%d0%be-%d1%81%d0%b8%d0%bc%d0%b1%d0%b8%d0%be%d1%84%d0%bb%d0%be%d1%80/22708/
		Enterococcus faecalis	1,5-4,5 х 10^7		

До українських виробників пробіотиків належить ПрАТ «Біофарма», АТ «Фармак», ДП «Ензим», ТзОВ «Астрафарм», ТОВ «Еліт-Фарм», ТзОВ «О.Д. Пролісок», та інші, що реєструють продукцію як біологічно-активні добавки.

Враховуючи, все вище сказане, пропоную виробляти 5% від загальної потреби.

Отже, потужність виробництва пробіотика Біфікол становитиме :

$G_{гп}$ = 8 806,9 * 5 / 100 = 440 кг/рік

Згідно даних патента найбільша кількість живих клітин $5{,}0\times10^{11}$ КУО/мл виділяється за 24 години. Концентрація біомаси (г/л) в культуральній рідині не наведена, зважаючи на компоненти поживного середовища розрахувати теоретичний вихід біомаси неможливо, тому для подальших розрахунків приймемо приблизну концентрацію біомаси 6 г/л. [45]

3.3. Розрахунок об’єму ферментера та кількості виробничих циклів

Щоб забезпечити медичну галузь пробіотиком «Біфікол» необхідно 440 кг/рік протягом $T_{рд}$ = 150 робочих днів.

Культивування для вирощення біомаси походить протягом 24 год. Також необхідно врахувати додаткові процеси підготовки ферментера: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація апарату (1 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год),що загалом займають 7 годин. $T_{цф}$ = 24 + 7 = 31 годин.

Розрахуємо кількість ферментаційних циклів на рік :

$$N_{цк} = 24 \times К1 \times T_{рд}/T_{цф} = 24 \times 1,1 \times 150 / 31 = 128 \text{ циклів}$$

Кількість продукту за цикл, кг /цикл:

$$G_{цк} = G_{гп}/N_{цк} = 440 / 128 = 3,4 \text{ кг/цикл}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат при виділенні Есв, $м^3$

$$V_{кр} = G_{цк} \cdot СР_{гп}/(X_{кр} \cdot (1-E_{св})) = 3,4 \times 0,95/(6 \times (1-0,18)) = 0,66 \text{ } м^3$$

Визначаємо робочий об'єм ферментера, $V_{рф}$, $м^3$

$$V_{рф} = V_{кр} /(1-E_{кр}) = 0,66/(1-0,18) = 0,8 \text{ } м^3$$

Приблизний геометричний об'єм ферментера, $м^3$

$$V_{пф} = V_{рф}/К_з = 0,8/0,8 = 1,00 \text{ } м^3$$

З таблиці вибираємо найближчий за об'ємом ферментер, $V_{гф}$ = 1,00 $м^3$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення $К_{уз}$,частка

$$К_{уз} = V_{рф}/V_{гф} = 0,8/1,00 = 0,8$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Заповнюємо стадію 1

Робочий об’єм ферментера:

$Vp_1 = V_{крф} /(1- E_{кр}) = 0,66 / (1 – 0,1) = 0,7$ м^3

Визначаємо об’єм поживного середовища ферментера

$V_{пс1} =V_{р1}/(1+X_{пм1}) = 0,7/(1+ 0,1) = 0,64$ м^3

Об’єм посівного матеріала

$V_{пм1} = V_{р1} -V_{пс1} = 0,7 – 0,64= 0,06$ м^3

Заповнюємо стадію 2

Оскільки об’єм посівного матеріала для ферментера дорівнює об’єму КР, що отримують у посівному апараті $V_{пм1} = V_{кр2}$

Робочий об’єм складе

$V_{р2} = V_{пм1}/(1-E_{кр}) = 0,06/(1-0,1) = 0,07$ м^3

Об’єм поживного середовища посівного апарата

$V_{пс2} = V_{пс2} = V_{р2}/(1+X_{пм}) = 0,07/1,1 = 0,064$ м^3

Об’єм посівного матеріала для посівного апарата

$V_{пм2} = V_{р2} -V_{пс2} = 0,07 – 0,064 = 0,006$ м^3 = 6 л

Приблизний геометричний об’єм посівного апарата

$V_{пр2} = V_{р2}/К_з = 0,07/0,8 = 0,088$ м^3

За таблицею Додатку 4 знаходимо найближчий за об’ємом посівний апарат $V_{гпа}$, = 0,10 м^3

Уточнюємо коєфіцієнт заповнення

$К_{уз} = V_{р2}/V_{гпа}$, = 0,06/0,10 = 0,7

Заповнюємо стадію 3

$V_{кр3} = V_{пм2}$ = 6 л, звідси робочий об’єм інокулятора складе

$V_{р3} = V_{кр3}/(1-E_{кр}) = 6/(1-0,1) = 6,7$ л

Об’єм поживного середовища інокулятора

$V_{пс3} = V_{р3}/(1+X_{пм}) = 6,7 / 1,1 = 6,1$ л

Об’єм посівного матеріала для інокулятора

$V_{пм3} = V_{р3} - V_{пс3} = 6,7 – 6,1 = 0,6$ л

Приблизний геометричний об’єм інокулятора

$V_{пр3} = V_{р3}/К_з = 6,7/0,8 = 8,4$ л

За таблицею Додатку 4 знаходимо найближчий за об’ємом

$V_{гін} = 10$ л

Уточнюємо коєфіцієнт заповнення

$К_{уз} = V_{р3}/V_{гін}, = 6,7/10 = 0,67$

Заповнюємо стадію 4

При визначенні кінцевих значень робочого об’єму ферментаційної апаратури менше Vр<2,0 розраховують кількість качалочних колб, виходячи з геометричного об’єму 1 колби $V_{гк} = 0,75$ л та коефіцієнту заповнення $К_{зк} = 0,8$.

Кількість колб рахується наступним чином $N_{колб} = V_{рк}/V_{гк} \cdot К_{зк}$.

$V_{кр4} = V_{пм3} = 0,6$ л. Оскільки об’єм менше 2,0 л, та враховуючи відсутність втрат за рахунок краплевиносу $E_{кр} = 0$, приймаємо робочий об’єм для колб $V_{р4} = V_{кр4} = 0,6$ л

Об’єм поживного середовища для колб

$V_{пс4} = V_{р4}/(1+X_{пм}) = 0,6/1,1 = 0,55$

Об’єм посівного матеріала для колб

$V_{пм4} = V_{р4} – V_{пс4} = 0,6 – 0,55 = 0,05$ л = 50 мл

Приблизна кількість качалочних колб становить :

$N_{пр4}= V_{р4}/(V_{гк}\cdot К_{зк}) = 0,6 / (0,75*0,8) = 0,83 = 1$ колба

Отже, для одержання посівного матеріалу необхідно 1 колба з гумовим корком для забезпечення анаеробних умов.

Процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу пробіотику у ферментері об'ємом 1,00 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,8 відбуватиметься у три етапи:

1 - вирощування посівного матеріалу в колбі об'ємом 750 мл

2 - вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

3 - вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

Таблця 3.3

Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

№ стадії	Об'єм КР, $V_{кр}$, м^3 (л)	Робочий об'єм ферментера, $V_р$, м^3 (л)	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}$, м^3 (л)	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$, м^3 (л)	Коефіцієнт заповнення , Кз, частка	Геометричний об'єм, $V_{гф}$, м^3 (л)
1	0,66	0,7	0,64	0,06	0,8	1,00
2	0,06	0,07	0,064	6 л	0,8	0,10
3	6 л	6,7 л	6,1 л	0,6 л	0,8	10 л
4	0,6 л	0,6 л	0,55 л	0,05 л	0,8	1 колба

РОЗДІЛ 4. Біосинтез пробіотика Біфікол

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у *Bifidobacterium bifidum*

Bifidobacterium bifidum 1 культивують на серидовищі де основним джерелом вуглецю є соєва сироватка, яка містить сахарозу. Основним джерелом вуглецю та енергії для біосинтезу біомаси є сахароза.

Оскільки в Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes відсутня інформація про шляхи катаболізму ростового субстрату для штаму *Bifidobacterium bifidum 1*, тому для побудови шляху катаболізму сахарози обираємо один з наявних штамів, а саме *Bifidobacterium bifidum S17*. [6]

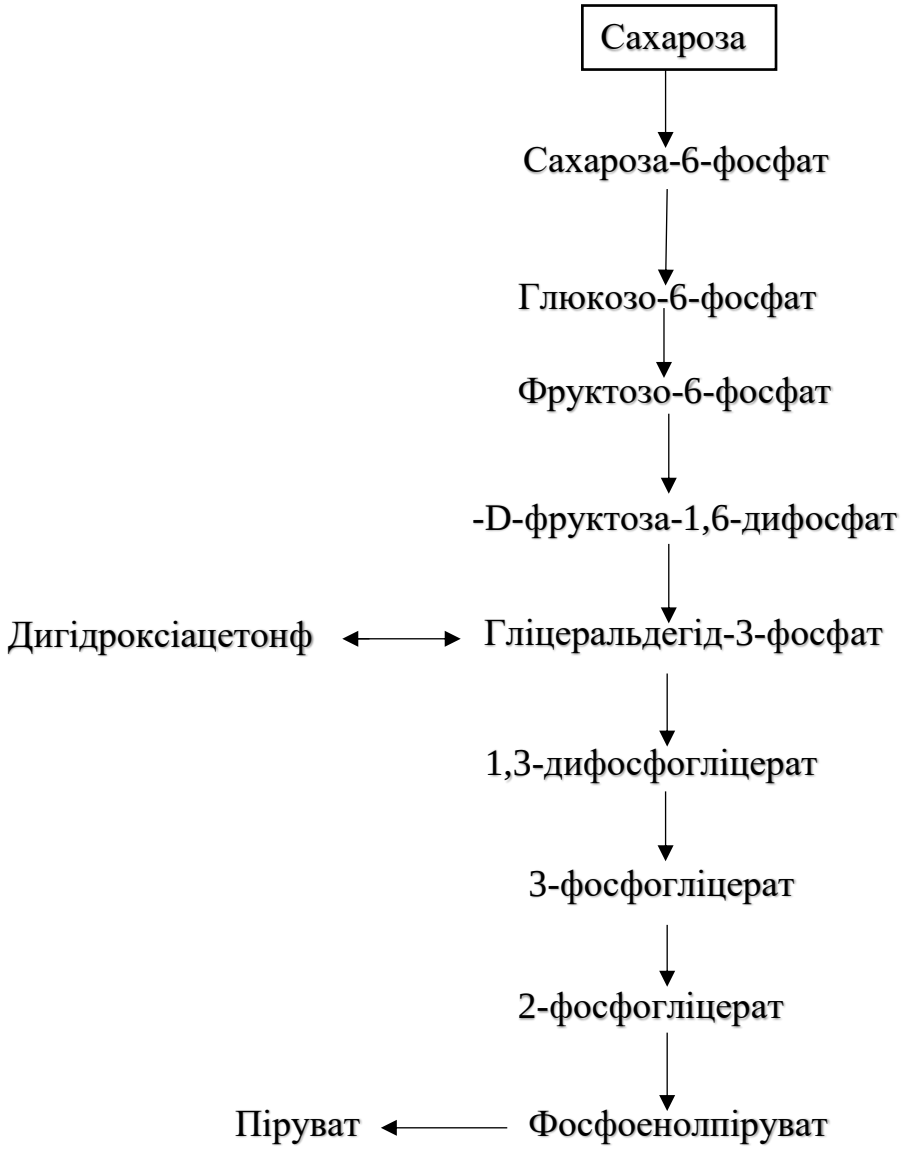

Рисунок 4.1 Катаболізм сахарози у *Bifidobacterium bifidum*

Ферменти: 1 - сахарозофосфотрансфераза (КФ 2.7.1.211), 2 - бетафруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26), 3- глюкозо6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9), 4 - фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11), 5 - фруктозо-біфосфатальдолаза клас 2 (КФ 4.1.2.13), 6 - тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1), 7 - гліцеральдегід- 3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12), 8 - фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3), 9 -–біфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11), 10 - енолаза (КФ 4.2.1.11), 11 - піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у пробіотик Біфікол

Ріст *Bifidobacterium bifidum 1* здійснюється на середовищі з сахарозою в якості субстрату. Сахароза каталізується до попередників амінокислот, жирних кислот, ліпідів, компонента клітинної стінки. Внаслідок катаболізму жирних кислот, утворюється ацетил-КоА. Потім ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК), де утворюється половина попередників основних метаболітів для біосинтезу біомаси.

Джерелом потрібних інтермедіатів для біосинтезу амінокислот є пентозофосфатний цикл. У якому утворюється фосфорибозилпірофсфат і еритрозо-4-фосфат.

В наслідок полімеризації ацетил-КоА через Ацетилпереносний-білок (АПБ) утворюються жирні кислоти.

У продуцента компонент клітинної стінки пептидоглікан утворюється з ацетилглюкозаміну і ацетилмурамової кислоти. [46]

Схема перетворення сахарози на біомасу наведено на рис. 4.2

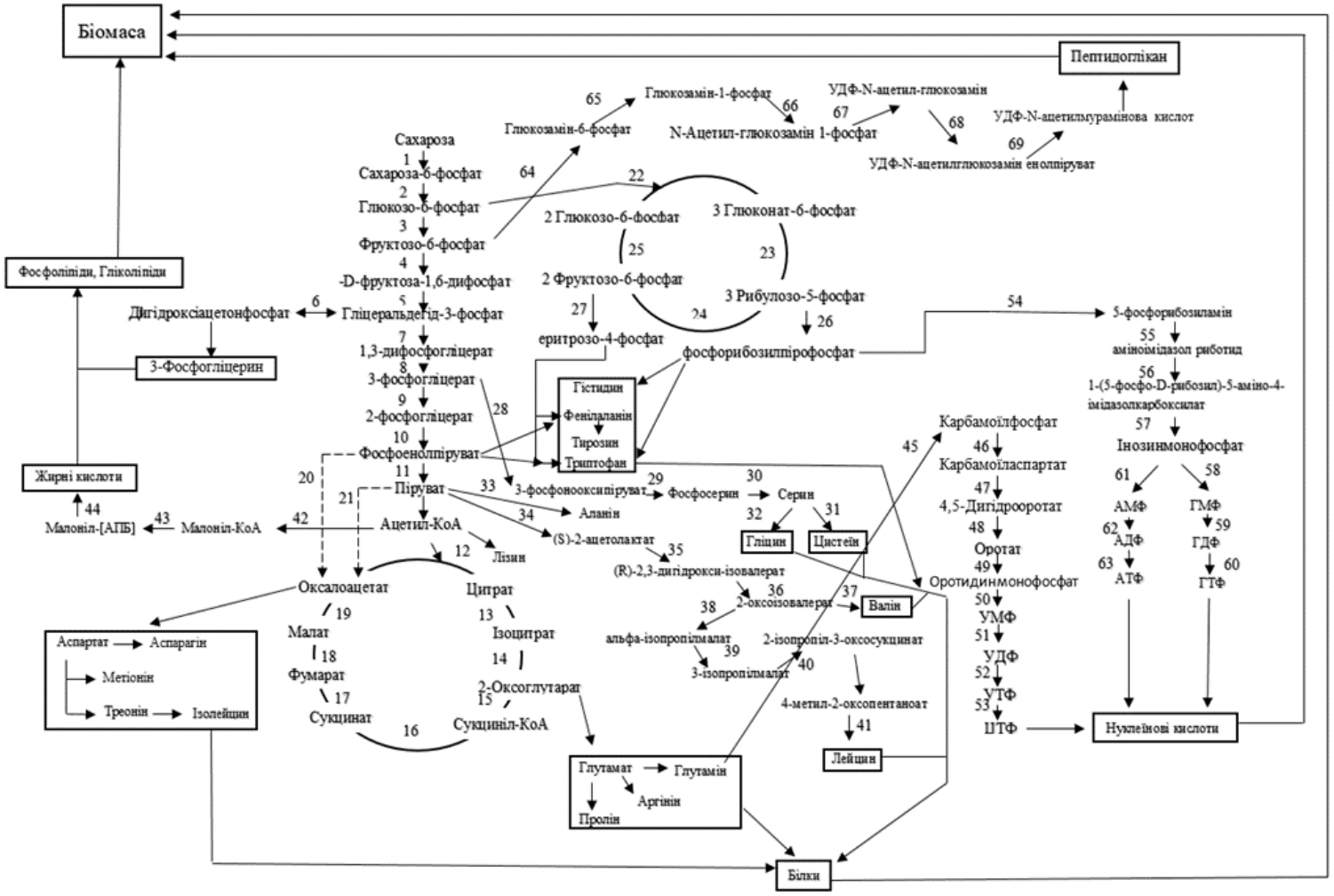

Рис. 4.2. Схема перетворення сахарози на біомасу

Ферменти: 1 - сахарозофосфотрансфераза (КФ 2.7.1.211), 2 - бетафруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26), 3- глюкозо6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9), 4 - фосфофруктокіназа (КФ, 2.7.1.11), 5 - фруктозо-біфосфатальдолаза клас 2 (КФ 4.1.2.13), 6 - тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1), 7 - гліцеральдегід- 3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12), 8 - фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3), 9 -–біфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ5.4.2.11) , 10 - енолаза (КФ 4.2.1.11), 11 - піруваткіназа (КФ 2.7.1.40), 12 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1), 13 –аконітатгідратаза (КФ4.2.1.3), 14 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42), 15 - дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4), 16 - сукциніл-КоА синтетаза, альфасубодиниця (КФ 6.2.1.5), 17 - субодиниця флавопротеїну сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.5.1), 18 - фумаратгідратаза (КФ 4.2.1.2), 19 - малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37), 20 - фосфоенолпіруваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31), 21 - піруваткаробоксилаза (КФ 6.4.1.1), 22 - глюкозо-6-фосфат-1-дегідрогеназа (КФ1.1.1.49), 23 - 6-фосфоглюконатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.44), фосфоглюконатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.343), 24 – транскетолаза (КФ 2.2.1.1), 25 - глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9), 26 - рибозо-фосфатпірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1), 27 – транскетолаза (КФ 2.2.1.1), 28 – D-3-фосфогліцератдегідрогеназа (КФ 1.1.1.95), 29 - фосфосеринамінотрансфераза (КФ 2.6.1.52), 30 – Фосфосеринфосфатаза (КФ 3.1.3.3), 31 – цистатіонін бета-синтаза (КФ 4.2.1.22), 32 – гліцингідроксиметилтрансфераза (КФ 2.1.2.1), 33 - Амінотрансфераза (КФ 2.6.1.2), 34 – велика субодиниця ацетолактатсинтази (КФ 2.2.1.6), 35 – редуктоізомераза кетолової кислоти (КФ1.1.1.86), 36 – Дигідроксикисла дегідратаза (КФ 4.2.1.9), 37 - Амінотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42), 38 - 2-ізопропілмалатсинтаза (КФ 2.3.3.13), 39 – 3-ізопропілмалатдегідратаза (КФ 4.2.1.33), 40 – 3-ізопропілмалатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.85), 41 - Амінотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42), 42 – ацетил-КоА-карбоксилаза (КФ 6.4.1.2), біотинкарбоксилаза (КФ 6.4.1.3), 43 - малілтрансфераза (КФ 2.3.1.39), 44 - еноіл-[білок-носій

ацилу] редуктаза (КФ 1.3.1.9), еноіл-[ацил-протеїн-переносник] редуктаза (NADPH) (КФ 1.3.1.104), 45 – карбамоїл-фосфатсинтаза (КФ 6.3.5.5), 46 – Аспартаткарбамоїлтрансфераза (КФ 2.1.3.2), 47 - Дигідрооротаза (КФ 3.5.2.3), 48 - дигідрооротатдегідрогеназа (КФ 1.3.1.14), Дигідрооротатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.2), 49 - Оротатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.10), 50 - Оротидин 5'-фосфатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.23), 51 - Уридилаткіназа (КФ 2.7.4.22), 52 - гуанозинтрифосфат-аденілаткіназа (КФ 2.7.4.6), 53 - ЦТФ-синтаза (КФ 6.3.4.2), 54 - амідофосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.14), 55 - фосфорибозиламін-гліцин-лігаза (КФ 6.3.4.13), Фосфорибозилгліцинамідформілтрансфераза (КФ 6.3.1.21), Фосфорибозилформілгліцинамідинсинтаза (КФ 6.3.5.3), фосфорибозилформілгліцинамідин циклолігаза (КФ 6.3.3.1), 56 - 5-(карбоксиаміно)імідазол рибонуклеотидсинтаза (КФ 6.3.4.18), 5-(карбоксиаміно)імідазол рибонуклеотидмутаза (КФ 5.4.99.18), 57 - фосфорибозиламіноімідазол-сукцинокарбоксамідсинтаза (КФ 6.3.2.6), Аденілосукцинатліаза (КФ 4.3.2.2), фосфорибозиламіноімідазолкарбоксамід формілтрансфераза (КФ 2.1.2.3), IMP циклогідролаза (КФ 3.5.4.10), 58 - IMP дегідрогеназа (КФ 1.1.1.205), амідотрансфераза (КФ 6.3.5.2), 59 - гуанілаткіназа (КФ 2.7.4.8), 60 - фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.4.6), 61 - дезаміназа аденілової кислоти (КФ 3.5.4.6), 62 - Аденілаткіназа (КФ 2.7.4.3), 63 - нуклеозид-дифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6), 64 - глутамінфруктозо-6-фосфаттрансаміназа (КФ 2.6.1.16), 65 - фосфоглюкозамінмутаза (КФ 5.4.2.10), 66 - глюкозамін-1-фосфат N-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.157), 67 - біфункціональна УДФ-N-ацетилглюкозамінпірофосфорилаза (КФ 2.7.7.23), 68 - УДФ-N-ацетилглюкозамін 1-карбоксивінілтрансфераза (КФ2.5.1.7), 69 - УДФ-N-ацетилмураматдегідрогеназа (КФ 1.3.1.98)

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Bifidobacterium bifidum – належить до облігатних анаеробних мікроорганізмів, що не здатні рости на поживних середовищ за наявності кисню. [62]

За температурним оптимумом – мезофіл, оптимальна температура для росту становить 37-41 °С. По відношенню до pH – нейтрофіли. Оптимальне значення pH 6,5-7,0. [62]

Хемоорганотроф, зброджує вуглеводи утворюючи оцтову та молочну кислоти, виділяє CO_2. Для росту на поживних середовищах потребує вітамінів, зокрема вітаміну С. [62]

Виходячи з особливостей біологічного агента *Bifidobacterium bifidum* , потрібно забезпечити анаеробні умови. Для забезпечення анаеробних умов у ферментер подають інертний газ – азот. В якості інертного газу також використовують аргон, водень, гелій або діоксид вуглецю. Використання азоту обгрунтоване тим, що цей газ повністю витискає кисень з ферментера.

Глибинний спосіб культивування дає змогу забезпечити анаеробні умови. Глибинне культивування має переваги: простота обслуговування та можливість автоматизації, скорочення виробничих площ, стерильність, підвищення продуктивності, регулювання параметрів в широких межах, більш раціональне використання сировини. [36]

Культивування можливе як періодичним так і безперервним способом. Періодичний метод культивування широко використовується в даний час. Основними чинниками, що обмежують розвиток мікроорганізмів за таких умов

це вичерпання компонентів поживного середовища та накопичення токсичних продуктів метаболізму. Цього можна запобігти, якщо здійснювати дробну подачу субстрату чи використовувати діалізні камери для вилучення небажаних метаболітів. [56]

Перспективним є безперервне культивування. Але нині такий спосіб культивування широко не застосовують у виробництві пробіотиків. [56]

Задля унеможливлення перехресної контамінації потрібно передбачати додаткові заходи, а саме організувати виробництва за принципом окремих циклів роботи з використанням закритих систем. Конструкція обладнання має запобігати зовнішній контамінації та забезпечувати зручність і ефективність його очищення та стерилізації. [56]

Оскільки під час споживання субстрату, можуть утворюватися органічні кислоти (оцтова, молочна), які можуть спричинити підкислення середовища, то необхідно передбачити наявність титрувального агента (NH_4OH) для регуляції pH.

Отже, культивування продуцента здійснюється періодично глибинним способом в анаеробних умовах (створюються за рахунок продування азотом для повного витиснення кисню) із забезпеченням асептики.

Ферментер для культивування *Bifidobacterium bifidum* має відповідати вимогам, які необхідні для росту і розмноження продуцента.

У процесі культивування продуцента анаеробні умови створюються в результаті відсутності подачі повітря в ферментер. Здійснюється барботування газовою сумішшю для підтримки відсутності кисню при культивуванні. Ферментер повинен бути оснащений барботером для подачі інертного газу, а саме азоту та датчиками pO2 для контролю анаеробних умов.

У процесі біосинтезу використовується лопатева мішалка (70 об/хв), що буде вмикатися на (2-3) хвилин тільки перед відбором проб та після подачі NH_4OH.

Для забезпечення сталої температури культивування ферментер оснащується сорочкою (для рівномірного розподілу тепла та його збереження) і датчиком температури.

Система піногасіння не потрібна, оскільки забезпечуються анаеробні умови.

Для відбору проб встановлюють пробовідбірники, так як через кожні 2 години культивування відбувається відбір проб культуральної рідини.

Для контролю рівня pH ферментер оснащується датчиком контролю pH. Контроль pH здійснюється за допомогою додавання NH_4OH.

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Оскільки *Bifidobacterium bifidum* є анаеробним мікроорганізмом, підготовка повітря для аерації не має сенсу. Для забезпечення анаеробних умов використовують інетрний газ – азот. Використання азоту обгрунтоване тим, що цей газ повністю витискає кисень з ферментера забезпечуючи анаеробні умови.

Азот зберігається в балонах, потім буде продуватися через газовий фільтр для отримання стерильного газу і далі подаватись в посівні апарати та ферментр.

Стерильне повітря потрібне у лабораторіях та боксах де працюють з посівним матеріалом, знезараження відбувається за допомогою ультрафіолетового випромінювання. [38]

Чисті зони для виробництва стерильної продукції класифікуються відповідно до характеристик згідно з вимогами GMP та потреб рівня чистоти приміщень, що їх оточують з метою усунення ризику контамінації. Ці зони

мають бути спроектовані так, щоб забезпечувати рівень чистоти повітря в оснащеному стані. Для виробництва стерильних лікарських засобів виділяють чотири класи.

Клас А — зона для операцій, при яких контамінація може становити високий ризик для якості продукції. Клас В – навколишнє середовище для зони класу А (підготовка інокуляту, виробничий біосинтез, розлив, сушіння, укупорка флаконів). [62]

Клас С і Д — чисті зони для здійснення менш критичної стадії виробництва стерильної продукції (приготування та зберігання поживного та захисного середовищ). [62]

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Класифікація дезинфікуючих засобів відносно діючої речовини:

спиртові (в основі спирти: етанол, ізопропанол, пропанол, бутандіол). Переваги: ефективні, не залишають слідів, випаровуються, безпечні, коштують недорого. Засоби: Дезодерм, Неостерил;

хлоровмісні (на основі хлору). Універсальні, швидко та безпечно діють, мають хлорний запах. Засоби: Гіпохлорит натрію, Вапно хлорне, Йод однохлористий, Дезактін, Ді-Хлор, Клорсепт, Новохлор-Екстра (Неохлор), Хлорамін Б, Хлорантоїн;

фенольні (діючі речовини – фенол і його похідні). Формують плівку захисту, завдяки цьому дезінфекційний ефект зберігається довше. Засоби: чистий фенол, трикрезол, креолін, лізол та ін.;

альдегідні (з компонентами альдегідів). Олійні рідкі засоби широкого спектру дії, з антибактеріальними і в’яжучими властивостями. Засоби: Глутаровий альдегід, Формалін;

пероксидоводневі (з перекису водню). Низькотоксичні, найбезпечніші для зовнішнього середовища деззасобами. Знезаражують корозійностійкі

металеві, скляниі і пластмасові поверхоні. Використовують Пероксид водню 35 %, 50 %, 60 %;

з третинних амінів. Малотоксичні, високі мийні параметри, ефективні проти більшості штамів бактерій. Засоби: Клерсайд Амін, Ультрадез, Оптімакс та інші;

з четвертинних амінів (з алкілдиметилбензиламонію хлориду, алкілдиметилетилбензиламонію хлориду). Мала токсичність, ефективні, діють на бактерії, віруси, гриби, плісняву і спори. Засоби: Дезефект, Максісан, Санімакс, Саніфект, Санокварт;

гуанідинові (гуанідин і його похідниі). Бактерицидна і віруліцидна дія. Нетоксичні;

комбіновані (у складі кілька активних компонентів з різних груп). Широкий спектр впливу на бактерії і мікроби. Засоби: Стериліум, Деконтадез, Деконтасофт, Віроцид, Дескосепт, Кристал 700, 900, 1000, Лізоформін 3000, Фамідез. [58]

Для того щоб вибрати мийний та дезінфікуючий засіб, необхідно врахувати його вартість та витрати на оброблення потрібної площі приміщення та обладнання. Витрати миючого чи дезінфікуючого засобу становить 100 мл на 1 $м^2$ (згідно з методичними рекомендаціями МОЗУ України від 14.12.2001 №502). [43]

Засоби для обробки поверхні приміщень та обладнання

Хлорамін Б – натрієва сіль хлораміду монобензолсульфокислоти, антимікробний препарат, дезінфектант з бактерицидним, віруліцидним та фунгіцидним ефектами. [65]

Хлорне вапно - це відбілювач і дезінфектант, технічна суміш, яка складається з гіпохлорит, гідроксид та хлорид кальцію. Має високу бактерицидну активність і здатне знищити вегетативні та спорові форми мікроорганізмів. [66]

Біомой - багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб з дезінфікуючим ефектом. Діюча речовина: сульфанол 5,0-8,0%, лужна протеаза 1,0-1,1%. Робочий розчин Біомою безбарвний, не ушкоджує оброблювані вироби і володіє емульгуючими і миючими властивостями. [23]

Санокварт – високоефективний концентрат проти бактерій, вірусів, грибків. Рідкий концентрат, має високу миючу здатність, на основі четвертинних амонієвих сполук. Низькотоксичний, не містить альдегідів, фенолів запашки, не має сенсибілізуючої дії. [54]

Дезактин – хлорвмісний препарат у вигляді порошку. Препарат призначений для дезінфекції та очищення поверхонь усіх видів. Має миючі якості. [33]

Аніосепт актив – концентрат у вигляді порошку білого кольору, добре розчинний у воді. Засіб не має окислювальних властивостей. Застосовується у вигляді водних робочих розчинів. Безбарвна прозора рідина з легким характерним запахом. Має гарні миючі властивості, не викликає корозії. [18,17]

UNI-1 – миючий засіб широкого спектра дії, має нейтральний pH, добре піниться. Ефективно видаляє забруднення з усіх водостійких поверхонь. При щоденному прибиранню не вимагає змивання, ефективний в малих концентраціях, не містить віддушки і барвника, нешкідливо для лакофарбових покриттів, нешкідливо для шкіри рук і навколишнього середовища. Склад: вода демінералізована, менше 5% неіоногенні ПАР, менше 5% аніонні ПАР, менше 5% амфотерні ПАР, глюконат натрію, консервант. [16]

DEZ-1 – концентрований миючий засіб з дезінфікуючим ефектом широкого спектра дії, містить активний хлор. Ефективний в малих концентраціях, не містить барвника, має хороше піноутворення, нешкідливий для навколишнього середовища. Склад: вода демінералізована, гіпохлорит натрію, гідроксид натрію, 5-15% неіоногенні ПАР, глюконат натрію. [4]

SUPRA –Висококонцентрований лужний високопінний миючий засіб, що представляє собою оптимізовану суміш ПАР і комплексоутворюючих речовин, водорозчинних, біорозкладністю. [15]

Засоби для обробки рук персоналу

Вінсепт - спирт етиловий – 67,5-70,0; спирт ізопропіловий – 1,0-2,5; 2-феноксіетанол – 0,05-2,5 (діючі речовини); гліцерин, пантенол. Виявляє широкий спектр антимікробних властивостей по відношенню до: грампозитивних і грамнегативних бактерій, вірусів, грибів роду Candida, патогенних дерматофітів, трихофітій, пліснявих грибів (у т.ч. Aspergillus niger, Aspergillus brasiliensis, Mucor). [31]

Деконтадез - (гуанідинова речовина полігексаметиленбігуанідин гідрохлорид та четвертинна амонієва сполука дидецилдиметиламоній хлорид). Для антибактеріального очищення шкіри і слизових, характеризується антивірусною дією. [34]

У кімнаті яка буде митися встановлюється ферментер на 1000 л, інокулятори на 100 л та 10 л.

Відстань між апаратами прийнято не менше 1 м (а саме 1,5 м), відстань до стін – 1,5 м. Апарат, що має найбільшу висоту 1,8 м - ферментер виробничий на 1000 л. Висоту кімнати приймаємо 5 м для врахування мийки та ремонту апаратів. Обладнання об’ємом 1000, 100 і 10 л займає разом площу в 4 м^2.

Загальна площа приміщення, де встановлено ферментер та два інокулятори становить 8 м × 4 м.

Загальна площа обробки приміщення становитиме:

$\sum F = (8 \text{ м} \times 4 \text{ м}) + (8 \text{ м} + 8\text{м} + 4\text{м} + 4\text{м}) \times 5 \text{ м} = 152 \text{ м}^2$

Таблиця 5.1

Узагальнена характеристика витрат дезінфікуючих засобів

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л (кг) мийного або дез. засобу, Грн/л (кг)	Вартість 1 л робочого розчину мийного або дез.засобу, Грн/л	Витрати роб.розчину, л/м^2	Ефективність використання дез.розчину, Едз, Грн/м2
Хлорамін Б	Обробка поверхонь приміщень	1%	660	6,6	0,1	100,32
Хлорне вапно (суміш з гіпохлори, гідроксид та хлорид кальцію)	Обробка поверхонь приміщень	1%	43,20	0,432	0,1	6,57
Дезактин (аніонні ПАР, дихлорантин, диметилгідантоїн)	Обробка поверхонь приміщень	0,2%	585	1,17	0,1	17,78

Закінчення таблиці 5.1

Аніосепт актив (перкарбонат натрію, тетраацетілетілендіамін, ЧАС)	Обробка обладнання	1%	832	8,32	0,1	3,33
Санокварт (ЧАС)	Обробка обладнання	1%	342	3,42	0,1	1,37
Дезактин	Обробка обладнання	0,2%	585	1,17	0,1	0,47

Таблиця 5.2

Узагальнена характеристика витрат миючих засобів

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л (кг) мийного або дез. засобу, Грн/л (кг)	Вартість 1 л робочого розчину мийного або дез.засобу, Грн/л	Витрати роб.розчину, л/м^2	Ефективність використання дез.розчину, Едз, Грн/м2
DEZ-1 (сумішш ПАР і комплексоутворюючих речовин)	Обробка поверхонь приміщень	2%	94,75	1,9	0,1	28,88

Закінчення таблиці 5.2

UNI-1 (ПАР)	Обробка поверхонь приміщень	0,5%	104	0,52	0,1	7,9
SUPRA (суміш ПАР і комплексоутворюючих речовини)	Обробка поверхонь приміщень	1%	91,67	0,92	0,1	13,98
Біомой (алкілбензол сульфонат натрію)	Обробка обладнання	0,5%	459	2,3	0,1	0,92
Кальцинована сода	Обробка обладнання	2%	75	1,5	0,1	0,6
Каустична сода	Обробка обладнання	2%	89	1,78	0,1	0,71

Критерієм вибору є мінімальна вартість обробки 1м^2 поверхні

$E_ф = \sum F \times D_{дз} \times B_{дз}$, Грн/м2, де

$\sum F$ – сумарна площа, що обробляється дез.розчинами; $м^2$; $D_{дз}$ – витрати дез.розчину на 1 $м^2$ поверхні, $л/м^2$; $B_{дз}$– вартість 1 л дез.розчину, Грн/л.

Відповідно за результатами розрахунків таблиці 2,1 та 2,2 обираємо найбільш ефективний дезінфікуючі та мийні засіби. Для обробки поверхні приміщень, відповідно до розрахунків, найбільш ефективним дезінфікуючим засобом є хлорне вапно та «Дезактин», а для обробки обладнання – «Санокварт» та «Дезактин».

Для обробки поверхні приміщень, відповідно до розрахунків, найбільш ефективним миючим засобом є «UNI-1» та «SUPRA», а для обробки обладнання – кальцинована сода та каустична сода. Для обробки рук використовуємо «Вінсепт», «Деконтадез».

Щоб уникнути утворення ризистентних форм мікроорганізмів, дезінфікуючі засіб слід змінювати через кожні 2 – 3 місяці, оскільки стороння мікробіота адаптується.

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого біосинтезу *Bifidobacterium bifidum* використовується середовище такого складу (г/л):

Соєва сироватка - 50

Лактоза - 1

Пептон - 1

Аскорбінова кислота - 0,5

Натрій лимоннокислий тризаміщений ($Na_3C_6H5O_7$) - 6

Калій фосфорнокислий двозаміщений (KH_2PO_4) - 2

Магній сірчанокислий ($MgSO_4 *7H_2O$) - 1,2

За розрахунками, наведеними в розділі 3, виробничий біосинтез відбувається в ферментері об'ємом 1,00 м^3 (1000 л), інокулят отримують у три етапи: у колбі, в інокуляторі об'ємом 10 л, в посівному апараті об'ємом 100 л.

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу у колбі будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм невеликий (0,05 л), для вирощування в інокуляторах і виробничого біосинтезу – безпосередньо у самих апаратах при pH 4 – 4,5 для унеможливлення випадання осаду фосфатів калію і магнію. Для цього необхідно передбачити у технологічній схемі відповідні допоміжні роботи (підготовку розчину соляної кислоти для зниження рівня pH до 4 – 4,5 при стерилізації солей в посівному апараті і ферментаторі та розчину NH_4OH для регуляції рівня pH при вирощування посівного матеріалу).

Вирощування інокуляту у колбах

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Bifidobacterium bifidum* , умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: соєва сироватка, лактоза, пептон (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: MgSO4 *7H2O, Na3C6H5O7 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: KH2PO4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Г: аскорбінова кислота (стерилізуюча фільтрація).

Компоненти композиції А стерилізують при темературі 112 ^{0}С протягом 30 хв, вони є термолабільними і потребують м`якого режиму стерилізації, ніж неорганічні солі. Композицію Б яку складають лимоннокислий натрій та магній сульфат стерилізуватимуть в іншій колбі при 131 °С, 40 хв, оскільки ці компоненти термостабільні.

Композицію В складає калій фосфорнокислий, оскільки при стерилізації з композицією Б можуть утворитися нерозчинні фосфати магнію. Стерилізують при 131 °С, 40 хв оскільки сіль теж термостабільна. Стерилізацію композицій А, Б і В здійснюють в автоклаві.

Композицію Г аскорбінова кислота, яка при нагріванні не витримує температуру вище 90 ^{0}С і є дуже термолабільною, стерилізація буде здійснюватись за допомогою фільтрації, діаметр пор становить 0,22 мкм.

Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

Стерилізація поживного середовища, необхідного для цієї стадії, здійснюється у відповідному посівному апараті, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: соєва сироватка, лактоза, пептон, (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: MgSO4 *7H2O, Na3C6H5O7, KH2PO4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, pH 4,0–4,5).

Композиція В: аскорбінова кислота (стерилізуюча фільтрація).

Стерилізація композиції А здійснюється в реакторі, стерилізація композиції Б – в інокуляторі. MgSO4 *7H2O та KH2PO4 можливо об'єднувати в одну композицію, але перед стерилізацією необхідно довести pH до 4,0 - 5,0 за допомогою розчину HCl, у такому випадку осади фосфатів калію і магнію не утворюються.

Композицію А перекачують в інокулятор за допомогою перестальтичного насоса.

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

Середовище ділять на такі композиції:

Композиція А: соєва сироватка, лактоза, пептон (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: MgSO4 *7H2O, Na3C6H5O7, KH2PO4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, pH 4,0 – 4,5).

Композиція В: аскорбінова кислота (стерилізуюча фільтрація).

Стерилізація композиції А здійснюється в реакторі, стерилізація композиції Б – в інокуляторі, композиції В – стерилізаційна фільтрація.

Композицію А перекачують в інокулятор за допомогою перестальтичного насоса.

Виробничий біосинтез у ферментері

Середовище ділять на такі композиції:

Композиція А: соєва сироватка, лактоза, пептон (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: MgSO4 *7H2O, Na3C6H5O7, KH2PO4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, pH 4,0 – 4,5).

Композиція В: аскорбінова кислота (стерилізуюча фільтрація).

Стерилізація композиції А здійснюється в реакторі, стерилізація композиції Б – в ферментері, композиції В – стерилізаційна фільтрація.

Композицію А перекачують в ферментер за допомогою перестальтичного насоса.

РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу біомаси *B. bifidum*

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
Б-1	Балон	1	Ємність 40 л, робочий тиск 14,7 МПа, вага балону 65 кг, виготовлений відповідно ГОСТ 949-73. Країна виробник Україна [21]
ГФ-2	Фільтр газовий	1	Фільтр газовий компактний FMC 03 DN15 2 бар Madas (Італія), Максимальний робочий тиск: 6 бар [32]
ІФ-3 ІФ-7 ІФ-11	Індивідуальний фільтр	3	Індивідуальний фільтр HEPA, клас фільтра H14, ефективність 99.995%, площа фільтрації 2,7 - 20 $м^2$, тестовано згідно EN 1822, стійкість до вологи до 100%, витримує температуру повітря до 70 °C, не містить силікон, має паспорт і висновок СЕС. Виробник NEW FILTER (Україна). [64]

Продовження таблиці 6.1

ЗБ- 13	Ємність для зберігання титруючого агента	1	Виробник ТОВ "ВК" "Енергопром"(Україна), 50 л. Виробляються з високоякісної нержавіючої сталі AISI 316. [35]
Н-14	Насос	3	Відцентровий хімічний насос DR015PDT11LIE. Виробник OTHER. Потужність двигуна: 1,5 Вт; максимальний робочий тиск: 1,2 бар; максимальна продуктивність - 15м3/год [44]
ІН-4	Інокулятор для вирощування посівного матеріалу об’ємом 10 л	1	Біореактор BLBIO-10SJA (Китай), робочий об'єм від 4,5 до 8 літрів. Ферментер виготовлений з нержавіючої сталі 316L. Розрахунковий тиск: Р (всередині) = 0,3 МПа, Р (проміжний шар) = 0,3 МПа, потужне перемішальне весло, обертів у ферментері: 70~1000 об/хв, датчик температури (США), датчик pH (Mettler, Швейцарія). [25]

Продовження таблиці 6.1

Р-5	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Виробник «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна). Реактор-змішувач СЕон 0,025 $м^3$ стальний емальований. Габаритні розміри: довжина – 520 мм; ширина – 450 мм; висота - 650 мм;. Перемішуючий пристрій – якірна мішалка з частотою обертання 50 об/хв. [50]
Р-6	Реактор-змішувач для приготування композиції В	1	Виробник «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна). Реактор-змішувач СЕон 0,010 $м^3$ стальний емальований. Габаритні розміри: довжина – 420 мм; ширина – 350 мм; висота - 500 мм;. Перемішуючий пристрій – якірна мішалка з частотою обертання 50 об/хв. [52]

Продовження таблиці 6.1

ІН-8	Інокулятор для вирощування посівного матеріалу об’ємом 100 л	1	Біореактор BLBIO -100SJA (Китай), робочий об'єм від 50 до 75 літрів, виготовлений з нержавіючої сталі 316L. Розрахунковий тиск: Р (всередині) = 0,3 МПа, Р (проміжний шар) = 0,3 МПа, потужне перемішальне весло, обертів у ферментері: 70~600 об/хв, датчик температури (США), датчик pH (Mettler, Швейцарія). [24]
Р-9	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Виробник ОВЕН (Україна). Ємність об’ємом 100 л встановлена на опори які виготовлені з труби, мобільна, на 4 колесах діаметром – 80 мм, кронштейн нержавіючий. Також на корпусі ємності розташована ручка для зручності транспортування. В кришку реактора вмонтовано привід мішалки мотор-редуктор NMRV 0,75кВт, всередині ємності встановлена пропелерна мішалка швидкість обертів 0 - 300 об/хв., Clamp DN65. [51]

Закінчення таблиці 6.1

Р-10	Реактор-змішувач для приготування композиції В		Реактор з нержавіючої сталі 316 Anvay Pharma; Об’ємом приблизно 75 літрів і робочим об’ємом 60 літрів. Номінальний тиск куртки 2,5 бар. Пристрій має мішалку з нержавіючої сталі якорного типу, що приводиться в дію двигуном 0,75 кВт. [53]
Ф-12	Ферментер для виробничого біосинтезу	1	Виробник - Bioengineering AG; Об’єм апарату – 1000 л; матеріал – нержавіюча сталь; перемішуючий пристрій - лопатева мішалка; обладнаний датчиками температури, pH, кисню, тиску.[63]

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми

ДР 1. Підготовка інертного газу для культивування

ДР 1.1. Подача інертного газу

Азот подається через вентель з балону (Б-1) до газового фільтра (ГФ-2).

ДР 1.2. Очищення азоту в індивідуальних фільтрах.

Індивідуальні фільтри (ІФ-3, ІФ-7, ІФ-11) встановлюються перед інокуляторами (ТП 4.4, ТП 4.5) та ферментером (ТП 5.1).

ДР 2. Приготування титрувальних агентів

ДР 2.1 Зберігання NH_4OH

Титруючий агент NH_4OH не потребує стерилізації та продається в готовому вигляді, не потребує приготування.

Необхідна кількість титранту:

Для інокулятора на 10 л – 10,2 мл

Для інокулятора на 100 л – 110 мл

Для ферментера на 1000 л – 1100 мл

Аміачну воду зберігають у збірнику який виготовляється з нержавіючої сталі. Насоси, крани та інші комунікації, що сполучають збірник з ферментером та інокулятором теж мають бути виготовлені з нержавіючої сталі. Збірник та комунікації повинні бути герметичними. Рівень аміачної води в збірнику має не первищувати 93 %.

Для перешкоджання випаровування аміаку використовують (ГСПС) герметизуючу самозатікаючу плівкоутворюючу суміш, яку потрібно заливати на поверхню аміачної води захисним шаром, який повинен бути не менше 3

см. Температура зберігання не повинна перевищувати 25 ° С.

Регулювання pH здійснюється розчином NH_4OH до ТП 4.5, ТП 4.6 та ТП 5.1.

ДР 2.2 Приготування розчину HCl для культивування в інокуляторі 10 л

Для приготування 10,2 мл 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 100 мл наливають за допомогою мірного циліндра на 100 мл – 8,5 мл дистильованої води і вносять за допомогою мірного циліндра на 10 мл при перемішуванні 1,7 мл 36%-ого розчину HCl. Рідини змішують у такому порядку з метою уникнення сильної екзотермічної реакції. Приготований розчин до ТП 4.5.

ДР2.3 Приготування розчину HCl для культивування в інокуляторі 100 л

Для приготування 110 мл 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 250 мл наливають за допомогою мірного циліндра на 250 мл –91,7 мл дистильованої води і вносять за допомогою мірного циліндра на 50 мл при перемішуванні 18,3 мл 36%-ого розчину HCl. Рідини змішують у такому порядку з метою уникнення сильної екзотермічної реакції. Приготований розчин до ТП 4.6

ДР 2.4 Приготування розчину HCl для культивування в ферментеріна 1000 л

Для приготування 1100 мл 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 1,5 л наливають за допомогою мірного циліндра на 1 л –917 мл дистильованої води і вносять за допомогою мірного циліндра на 250 мл при перемішуванні 183 мл 36%-ого розчину HCl. Рідини змішують у такому порядку з метою уникнення сильної екзотермічної реакції. Приготований розчин до ТП 5.1

ДР 3. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування у колбах

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах наведений у табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування середовища у колбах

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 0,55 л середовища, г**	**Композиції**	**Об'єм композиції, V, л**
Соєва сироватка	50	27,5	А	0,24
Пептон	1	0,55		
Лактоза	1	0,55		
Вода		240 мл		
Лимонокислий натрій	5	2,75	Б	0,18
$MgSO_4*7H_2O$	1,2	0,66		
Вода		180 мл		
K_2HPO_4	2	1,1	В	0,07
Вода		70 мл		
Аскорбінова кислота	0,5	0,275	Г	0,06
Вода		60 мл		
Усього				**0,55**

ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 27,5 г соєвої сироватки, 0,55 г пептону, 0,55 г лактози. Наважки поміщають у колбу об'ємом 500 мл, додають 240 мл води водопровідної, яку попередньо відміряють у мірному циліндрі місткістю 500 мл, перемішують, закривають корком. Колбу ставлять у автоклав,

встановлюють режим стерилізації 112 ˚С, 30 хв. Простерилізований розчин до ТП 4.4. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 2,75 г лимоннокислого натрію, 0,66 г $MgSO_4 \times 7H_2O$. Наважки поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають 180 мл води водопровідної, яку попередньо відміряють у мірному циліндрі місткістю 250 мл, перемішують, закривають корком і стерилізують в автоклаві при температурі 131 ºС, 40 хв. Простерилізований розчин до ТП 4.4. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 1,1 г K_2HPO_4. Наважку поміщають у колбу об'ємом 150 мл, додають 70 мл води водопровідної, яку попередньо відміряють у мірному циліндрі місткістю 250 мл, перемішують, закривають корком і стерилізують в автоклаві при температурі 131 ºС, 40 хв. Простерилізований розчин до ТП 4.4.Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти

ДР 3.1.4. Приготування і стерилізація композиції Г

На аналітичних вагах зважують 0,275 г аскорбінової кислоти. Наважку поміщають у колбу об'ємом 100 мл, додають 60 мл води водопровідної, яку попередньо відміряють у мірному циліндрі місткістю 100 мл, перемішують. Пропускають через фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Простерилізований розчин до ТП 4.4. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для інокулятора об'ємом 10л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об’ємом 10 л (ІН-4) наведений у табл. 7.2

Таблиця 7.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування середовища в інокуляторі об’ємом 10 л

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 6,1 л середовища, г**	**Композиції**	**Об’єм композиції, V, л**
Соєва сироватка Пептон Лактоза	50 1 1	305 6,1 6,1	А	2,2
Вода		2,2 л		
Лимонокислий натрій $MgSO_4*7H_2O$ K_2HPO_4	5 1,2 2	30,5 7,32 12,2	Б	2,2
Вода		2,2 л		
Аскорбінова кислота	0,5	3,05	В	1,7
Вода		1,7 л		
Усього				**6,1**

ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 305 г соєвої сироватки, 6,1 г пептону, 6,1 г лактози, наважку поміщають у колбу об’ємом 2,5 л. Туди ж додають 2,2 л води водопровідної яку попередньо відміряли у мірному циліндрі об’ємом 1 л. перемішують, закривають корком і колбу відправляють у автоклав,

встановлюють режим стерилізації 112 ˚С, 30 хв. Простерилізований розчин до ТП 4.5. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 30,5 г лимоннокислого натрію, 7,32 г $MgSO_4*7H_2O$, 12,2 г K_2HPO_4. Наважки переносять в інокулятор, добавляють 2,2 л водопровідної води, перемішують. До отриманого розчину при перемішуванні за допомогою автоматизованої системи титрування додають 6 %–й розчин HCl від ДР 2.2 до pH 4,5. Стерилізують в інокуляторі при температурі 131 °С упродовж 40 хв. Простерилізований розчин до ТП 4.5. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 3,05 г аскорбінової кислоти. Наважку поміщають у колбу об’ємом 2 л, додають 1,7 л водопровідної води, перемішують. Пропускають через фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Простерилізований розчин до ТП 4.5. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для середовищ для інокулятора об’ємом 100 л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об’ємом 100 л (ІН-8) наведений у табл. 7,3.

Таблиця 7.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування середовища в інокуляторі об'ємом 100 л

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 64 л середовища, г**	**Композиції**	**Об'єм композиції, V, л**
Соєва сироватка	50	3200	А	22,5
Пептон	1	64		
Лактоза	1	64		
Вода		22,5 л		
Конденсат		2,5 л		2,5
Лимонокислий натрій	5	320	Б	27
$MgSO_4*7H_2O$	1,2	76,8		
K_2HPO_4	2	128		
Вода		27 л		
Конденсат		3 л		3
Аскорбінова кислота	0,5	32	В	8,1
Вода		8,1 л		
Конденсат		0,9 л		0,9
Усього				**64**

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 3200 г соєвої сироватки, 64 г пептону, 64 г лактози. Наважки переносять у реактор–змішувач (Р-5), через лічільник додають 22,5 л води водопровідної через лічильник (враховуючи 10 % конденсату при подальшій стерилізації). Стерилізують в реакторі при

температурі 112 ºС (30 хв). Простерилізований розчин до ТП 4.6. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 320 г лимоннокислого натрію, 76,8 г MgSO4*7H2O, 128 г K2HPO4. Наважки поміщають в інокулятор (ІН-8), добавляють 27 л водопровідної води через лічильник, перемішують. До отриманого розчину при перемішуванні за допомогою автоматизованої системи титрування додають 6 %–й розчин HCl від ДР 2.2 до pH 4,5. Стерилізують в інокуляторі при температурі 131 °С упродовж 40 хв. Простерилізований розчин до ТП 4.6. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.3.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 32 г аскорбінової кислоти. Наважку поміщають у реактор-змішувач (Р-6), через лічильник додають 8,1 л води водопровідної, перемішують. Пропускають через фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Простерилізований розчин до ТП 4.6. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживних середовищ для ферментера об’ємом 1000 л

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об’ємом 1000 л (Ф-12) наведений у табл. 7,4.

Таблиця 7.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування середовища у ферментері об'ємом 1000 л

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 640 л середовища, г**	**Композиції**	**Об'єм композиції, V, л**
Соєва сироватка	50	32000		
Пептон	1	640		
Лактоза	1	640		
			А	81
Вода		81 л		
Конденсат		9 л		9
Лимонокислий натрій	5	3200		
$MgSO_4*7H_2O$	1,2	768	Б	450
K_2HPO_4	2	1280		
Вода		450 л		
Конденсат		50 л		50
Аскорбінова кислота	0,5	320	В	45
Вода		45 л		
Конденат		5 л		5
Усього				**640**

ДР 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 32000 г соєвої сироватки, 640 г пептону, 640 г лактози, наважку поміщають у реактор-змішувач (Р-9), через лічільник

доливають 81 л води водопровідної (попередньо врахувавши 10 % конденсату від робочого об'єму ферментера). Встановлюють режим стерилізації 112 ◦С, 0,05 МПа, 30 хв, стерилізують у реакторі. Простерилізований розчин до ТП 5.1. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 3200 г лимоннокислого натрію, 768 г $MgSO_4*7H_2O$, 1280 г K_2HPO_4, наважку поміщають у ферментер (Ф-12), через лічільник подають 450 л води водопровідної (попередньо врахувавши 10 % конденсату від робочого об'єму). До отриманого розчину при перемішуванні за допомогою автоматизованої системи титрування додають 6 %–й розчин HCl від ДР 2.3 підкислюють до pH 4,5. Стерилізують у ферментері 131 °С, 40 хв. . Простерилізований розчин до ТП 5.1. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 3.4.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 320 г аскорбінової кислоти. Наважку поміщають у реактор-змішувач (Р-10), через лічильник додають 45 л води водопровідної , перемішують. Пропускають через фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Простерилізований розчин до ТП 5.1. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1 Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Bifidobacterium bifidum 1* зберігають у стані ліофілізації в запаяних флаконах (ампулах), за температури -20 ºС до 5 років.

ТП 4.2. Одержання агаризованої робочої культури

Для одержання агаризованої робочої культури використовують флакони (ампули) з ліофілізованою культурою біфідобактерій від ТП 4.1 у які вносять фізіологічний розчин хлориду натрію (1 мл на дозу), ретельно перемішують та

висівають у чашки Петрі в середовище Біфідум. Вирощують у термостаті при температурі 37 ^{0}С упродовж 72 годин. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікрофлори.

ТП 4.3. Одержання рідкої робочої культури

Культуру від ТП 4.2 засівають у колби із середовищем Біфідум, закривають кришкою для забезпечення анаеробних умов. Вирощують у термостаті при температурі 37 ^{0}С упродовж 72 годин. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікрофлори.

ТП 4.4. Вирощування культури у колбі

У колбу об'ємом 0,75 л з стерильною композицією А (від ДР 3.1.1) зливають простерилізовані композиції Б (від ДР 3.1.2), В (від ДР 3.1.3), Г (від ДР 3.1.4). Робочу культуру (від ТП 4.3) переливають у колбу з поживним середовищем, компоненти перемішують. Закривають гумовою пробкою, щоб забезпечити анаеробні умови, і поміщають у термостат. Тривалість вирощування – 72 год, температура 37 ^{0}С. Проводять мікроскопічний та мікробіологічний контроль.

ТП 4.5. Вирощування культури в інокуляторі об`ємом 10 л

В інокулятор об`ємом 10 л з простерелізованою композицією Б (від ДР 3.2.2), переносять з реактора (Р-5) композицію А (від ДР 3.2.1), з реактора (Р-6) В (від ДР 3.2.3). Вирівнюють pH до 6,8 - 7,0 розчином NH_4OH (від ДР 2.1) за допомогою автоматизованої системи подачі титранта. Потім додають посівний матеріал (від ТП 4.4) через трубу перетискування, подають через барботер газоподібний азот для витіснення повітря і забезпечення анаеробних умов, потім герметизують і починають культивування. Температура становить 37 ^{0}С, тривалість 72 год. Відбирається культуральна рідина, проводиться мікробіологічний і мікроскопічний контроль.

ТП 4.6. Вирощування культури в інокуляторі об`ємом 100 л

В посівний апарат (ІН-8) об’ємом 100 л з простерилізованим розчином композиції Б (від ДР 3.3.2), самоплино з реактора (Р-9) вносять композицію А (від ДР 3.3.1) та з реактора (Р-10) композицію В (від ДР 3.3.3). Вирівнюють pH до 6,8 - 7,0 розчином NH_4OH (від ДР 2.1) за допомогою автоматизованої системи подачі титранта. Далі подають посівний матеріал (від ТП 4.5) через трубу перетискування. Перемішують і культивують в анаеробних умовах протягом 72 год. при температурі 37 ^{0}С, подають через барбортер газоподібний азот для витіснення повітря і забезпечення анаеробних умов. Відбирається культуральна рідина, проводиться мікроскопічний та мікробіологічний контроль. Якщо посівний матеріал відповідає всім вимогам, його відправляють на стадію виробничого біосинтезу.

ТП 5. Виробничий біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 1000 л

У простерилізований ферментер (Ф-12) об'ємом 1000 л з простерилізованою композицією Б (від ДР 3.3.2) додають самоплином простерилізовану композицію А (від ДР 3.3.1), В (від ДР 3.3.3). Вирівнюють pH до 6,8 - 7,0 розчином NH_4OH (від ДР 2.1) за допомогою автоматизованої системи подачі титранта. Посівний матеріал (від ТП 4.6) подають через трубу перетискання від інокулятора на 100 л. Забезпечуються умови біосинтезу: pH 6,8 – 7 яке регулюється подачею NH_4OH (від ДР 2.1) , температура повинна становити 37 ^{0}С, забезпечення повністю безкисневих умов здійснюється за допомогою інертного газу - азоту. Процес культивування триває 24 год. Перемішуючий пристрій вмикають (на 2-3 хв) тільки перед відбором проб та після подачі титранта з частотою обертання 70 об/хв. Кожні 2 години відбираються проби для мікробіологічного контролю і визначення концентрації живих клітин. Культивування закінчується, коли кількість живих біфідобактерій досягає значення 10^9 КУО/см^3 або коли відбувається припинення зниження pH, що свідчить про нездатність більшості клітин зброджувати лактозу.

РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва

8.1. Карта постадійного контролю

Карта постадійного контролю

Таблиця 8.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт ДР 1.1 *Подача інертного газу*	ступінь очищення, азот після проходження газового фільтра	згідно з паспортом	після проходження через газовий фільтр	Е = 99 %
Кт ДР 1.2 *Очищення азоту в індивідуальному фільтрі*	ступінь очищення, азот після проходження індивідуального фільтра	згідно з паспортом	після проходження через індивідуальний фільтр	Е = 99,99 %

Продовження таблиці 8.1

Кт *ДР 2.1 Зберігання NH_4OH*	температура	Термометр, мікробіологічний контроль	мікробіологічний контроль	Т = 25 °С
Кх *ДР 2.2 Приготування розчину HCl для культивування в інокуляторі на 10 л*	концентрація	Хімічний метод	Концентрація після приготування	С= 6%
Кх *ДР 2.3 Приготування розчину HCl для культивування в інокуляторі* *На 100 л*	концентрація	Хімічний метод	Концентрація після приготування розчину,	С= 6%
Кх *ДР 2.4 Приготування розчину HCl для культивування в ферментері* *на 1000 л*	концентрація	Хімічний метод	Концентрація після приготування розчину	С= 6%

Продовження таблиці 8.1

Кт, Км *ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А*	Композиція А температура, час, стерильність	термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112°С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км ДР 3.1.2 *Приготування і стерилізація композиції Б*	Композиція Б температура, час, стерильність	термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131°С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км ДР 3.1.3 *Приготування і стерилізація композиції В*	Композиція В температура, час, стерильність	термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131°С, τ = 40 хв відсутність мікробіоти
Кт, Км ДР 3.1.4 *Приготування і стерилізація композиції Г*	Композиція Г стерильність	мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після стерилізації	Пори 0,22 мкм, відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 8.1

Кт, Км *ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А*	Композиція А температура, час, стерильність	термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112°С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх *ДР 3.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б*	Композиція Б, температура, час, pH, стерильність	термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131°С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км *ДР 3.2.3 Приготування і стерилізація композиції В*	Композиція В, стерильність	мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після стерилізації	Пори 0,22 мкм, відсутність мікробіоти
Кт, Км ДР 2.3.1; 3.3.1 *Приготування і стерилізація композиції А*	Композиція А, температура, час, стерильність	термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112°С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 8.1

Кт, Км ДР 2.3.2; 3.3.2 *Приготування і стерилізація композиції Б*	Композиція Б, температура, час, pH, стерильність	термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131°С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км ДР 2.3.2; 3.3.3 *Приготування і стерилізація композиції В*	Композиція В, стерильність	мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після стерилізації	Пори 0,22 мкм, відсутність мікробіоти
Кт, Км *ТП 4.1 Підтримання колекційної культури*	Колекційна культура *Bifidobacterium bifidum 1* температура, мікробіологічна чистота	Мікробіологічний контроль, датчик температури	Мікробіологічний контроль, температура при зберіганні	відсутність сторонньої мікробіоти, t^o = -20 °С
Кт, Км *ТП 4.2. Одержання робочої агаризованої культури*	Робоча агаризована культура *Bifidobacterium bifidum 1* в чашках Петрі, температура, час, мікробіологічна чистота	термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура – під час вирощування в термостаті, мікробіологічний контроль – після вирощування	t^o = 37 °С τ = 72 год відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження таблиці 8.1

Кт, Км *ТП 4.3. Одержання робочої рідкої культури*	Робоча рідка культура *Bifidobacterium bifidum 1* в пробірках, температура, час, мікробіологічна чистота	термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура – під час вирощування в термостаті, мікробіологічний контроль – після вирощування	t^o = 37 ºС τ = 72 год відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км ТП *4.4 Вирощування культури в колбах*	Посівний матеріал температура, час, мікробіологічна чистота	термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура контролюється під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t^o = 37 ºС τ = 72 год відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх *ТП 4.5 Вирощування культури в інокуляторі об`ємом 10 л*	Посівний матеріал температура, час, pH, мікробіологічна чистота, витрата азоту	Термометр, годинник, pH-метр, мікробіологічний контроль	Температура, pH підтримується автоматично, мікробіологічний контроль	t^o = 37ºС τ = 72 год pH = 6,8–7,0 відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення таблиці 8.1

Кт, Км, Кх *ТП 4.6 Вирощування культури в інокуляторі об`ємом 100 л*	Посівний матеріал температура, час, pH, мікробіологічна чистота, витрата азоту	Термометр, годинник, pH-метр, мікробіологічний контроль	Температура, pH підтримується автоматично, мікробіологічний контроль	$t^o = 37^oC$ $\tau = 72$ год pH = 6,8–7,0 відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх *ТП 5.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 1000 л*	Культуральна рідина температура, час, рівень pH, мікробіологічна чистота культури, витрата азоту, концентрація біомаси	Термометр, годинник, pH-метр, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, pH підтримується автоматично, мікробіологічний контроль	$t^o = 37\pm1\ ^oC$ $\tau = 24$ год pH = 6,8-7,0 $\omega = 70$ об/хв 10^9 КУО/мл відсутність сторонньої мікробіоти

8.2. Мікробіологічний контроль

8.2.1 Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Мікробіологічний контроль здійснюють двома методами – мікроскопічним (експрес-метод) та мікробіологічним – висівом по відповідні поживні середовища.

Мікроскопічний метод

Мікроскопіювання здійснюють з використанням препарату «роздавлена крапля». Препарат готують на знежиреному предметному склі, наносячи краплю культуральної рідини та накривають покривним скельцем. Розглядають за допомогою мікроскопа з об'єктивом 40х, а також з імерсійною системою 90х.

Мікробіологічний метод

Здійснюють посіви на чашки Петрі з МПА – для виявлення бактерій та висів на сусло-агар – для виявлення грибів і дріжджів. Для розподілення суспензії по поверхні середовища використовують стерильну бактеріологічну петлю або шпатель Дригальського. Посіви витримують у термостаті за температури 30 - 32 °С. Аналіз здійснюють через 6-8 год. Візуально визначають відсутність ознак росту на поверхні поживних середовищ. [40]

8.2.2 Мікробіологічний контроль чистоти культури

Мікробіологічний контроль культури *Bifidobacterium bifidum* здійснюють за допомогою мікроскопіювання, та здійснюють висів на МПА після чого витримують у термостаті при (38±1) °С упродовж 48 год. Та здійснюють висів на агаризоване середовище Сабуро для виявлення сторонньої бактеріальної і грибної мікрофлори та поміщають у термостат за температури (22±1) °С упродовж 72 год. Відповідно до результатів контролю препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, плісняви та дріжджоподібних грибів. [56]

Середовища для культивування *Bifidobacterium bifidum*:

Середовище Блаурокка за температури 37 °С, pH 7,0 - 7,2

Середовище Біфідум за температури 37 °С, pH 6,8 - 7,3

Кукурудзяно-лактозне середовище за температури 37 °С, pH 7,4 - 7,5

Модифіковане середовище МРС за температури 37 °С, pH 6,4 – 6,8 [56]

При вирощуванні на агаризованому середовищі Блаурокка в анаеробних умовах біфідобактеерії утворюють гладенькі, випуклі колонії кремового або білого кольору, блискучі та м'якої консистенції. У товщі агару утворюють колонії у вигляді "гречаного зернятка" або "диску".[48]

Для мікроскопіювання з колоній готують мазки, які фарбують за Грамом або метиленовим блакитним. Для приготування препарату на чисте предметне скло за допомогою петлі наносять невелику краплю матеріалу, що досліджується, і розподіляють на площі біля 1 куб.см. Препарат висушують при кімнатній температурі, фіксують у полум'ї нагрівача і фарбують метиленовим блакитним або за Грамом. Біфідобактерії фарбуються метиленовим блакитним у синій колір, а за Грамом позитивно, і в мазках, звичайно, мають вигляд паличок різної форми (короткі, правильні, тонкі клітини із загостреними кінцями; кокоподібні правильні клітини; довгі злегка вигнуті або із виступами, або надзвичайно різноманітним розгалуженням; гострі, іноді біфурковані з закругленими або лопатоподібними кінцями; поодинокі або у ланцюжках, зіркоподібних скупченнях або розміщених у вигляді літери V, китайських ієрогліфів або палісадно). [48]

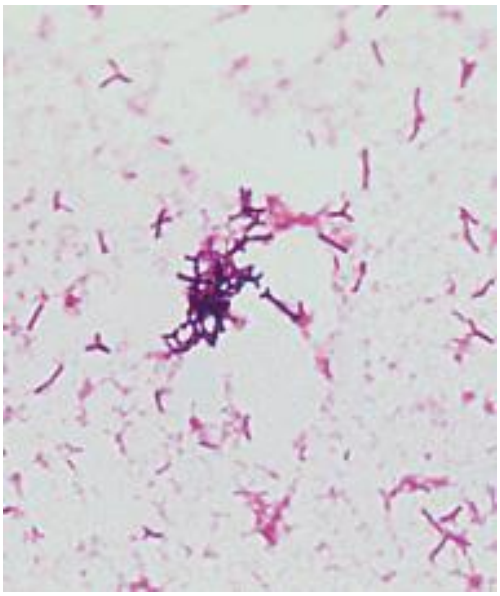

Рис.8.1. Колонії *Bifidobacterium bifidum*, пофарбовані за Грамом [3]

8.3. Показники росту і синтезу біомаси *Bifidobacterium bifidum*

8.3.1. Кількість живих клітин *Bifidobacterium bifidum*

Кількісний підрахунок живих клітин проводиться методом Коха. Суть методу заключається у висіві певного об'єму досліджуваної суспензії у чашки Петрі на середовище Біфідум з наступним підрахунком кількості колоній, що виросли.

З одержаних (попередньо ретельно перемішаних) розведень здійснюють висіви на чашки Петрі з середовищем Біфідум. Чашки поміщають в анаеростат, забезпечують температуру 37°С і через 72 год здійснюють підрахунок кількості колоній.

Визначення кількості мікроорганізмів здійснюють, знаючи кількість колоній і ступінь розведення за формулою:

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

Відповідно де N – кількість мікроорганізмів в 1 мл суспензії; К − розведення, з якого здійснено висів; а − середня кількість колоній на чашці Петрі за розведення К; V − об'єм суспензії, взятий для посіву, мл; 2 − критерій при 9 % рівні значущості; σ − середнє квадратичне відхилення, рівне ± ∑a /n, n − кількість повторностей. [37]

8.3.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом вуглецю в середовищі є сахароза, яка є основним вуглеводом компонента поживного середовища - соєвої сироватки. Концентрацію сахарози в поживному середовищі визначають за допомогою кондуктометричного ферментного біосенсора, що базується на каскаді ферментативних реакцій. Інвертаза, мутаротаза і глюкозооксидаза поступово

розщеплюють сахарозу до H_2O_2 та D-глюконолактону. Глюконолактон гідролізується до глюконової кислоти, яка дисоціює на кислотний залишок і протон, що змінює провідність розчину, яку реєструють за допомогою кондуктометричного перетворювача. [39]

Визначення концентрації джерела азоту

Джерелом азоту в середовищі для культивування є пептон, визначатимемо кількість амінного азоту.

Спосіб визначення амінного азоту мідним способом полягає в здатності амінокислот та пептидів утворювати комплексні розчинні сполуки з міддю, які визначають йодометрично.

Суть методу полягає у тому, що до відповідної кількості досліджуваного розчину, в якому міститься суміш амінокислот і пептидів, додають при слабколужній реакції надлишок суспензії фосфорнокислої міді в боратному буфері. Після збовтування у розчин переходять мідні солі амінокислот. Надлишок фосфату міді відфільтровують та додають оцтову кислоту і йодистий калій. Після чого відбувається реакція:

$$2Cu(CH_3COO)_2 + 4KI = 2CuI + I_2 + 4CH_3COOK$$

Йод, що виділився в результаті реакції, відтитровують слабким розчином гіпосульфіту. Мілілітр 0,01 н. $Na_2S_2O_3$ дорівнює 0,28 мг амінного азоту.

Одночасно проводять і контрольний дослід, де в якості досліджуваного розчину беруть дистильовану воду.

Визначається за формулою:

$$X = \frac{(а - в) * 0{,}28}{n}$$

Відповідно де X – вміст амонійного азоту, мг/л; а – кількість 0,01 н. розчину тіосульфату натрію, витрачена на титрування дослідного зразка, мл;

в – кількість 0,01 н. розчину тіосульфату натрію, витрачена на титрування контролю, мл; n – кількість досліджуваного розчину, яку взята для аналізу, мл. [60]

8.4. Показники якості пробіотика Біфікол

Визначення показників якості, біологічної дії Біфіколу відбувається згідно Специфікації, що наведено нижче.

СПЕЦИФІКАЦІЯ

БІФІКОЛ

Таблця 8.2

№	Найменування показників контролю	Встановленні значення	Методи контролю
1	Опис	порошок (кристалічна або пориста маса) різних відтінків коричневого кольору, має специфічний запах і смак.	За п.1, візуально
2	Ідентифікація	*Bifidobacterium bifidum* - нерухливі, грампозитивні поліморфні палички з біфуркацією на одному або двох кінцях, довжиною 4-5 мкм, у вигляді скупчень або окремих клітин. Облігатний анаероб. На напіврідких середовищах колонії біфідобактерій мають форму дрібних «цвяхів», «крихток», «ниток» білого кольору. *Escherichia coli* - дрібні грамнегативні палички (0,5*2,0 мкм), аспорогенні, переважно рухливі, властивий широкий спектр ферментативної активності. На середовищі МПА утворюють круглі з рівними краями випуклі колонії, на середовищі Ендо утворюють червоні колонії з металевим блиском.	За п. 2 АНД Бактеріоскопічно, бактеріологічно

Продовження таблиці 8.2

3	Однорідність маси	Припустиме відхилення 10 %	За п.3 ДФУ, 2.9.5.
4	Маса вмісту контейнера	0,5 г	За п.4 АНД Зважування
5	Розчинність	При додаванні води утворює гомогенну суспензію з різними відтінками коричневого кольору (можлива наявність дрібних пластівців).	За п.5, АНД візуально
6	Прозорість	Зависьмає бути непрозорою	За п.6, ДФУ, 2.2.1
7	Кольоровість	Зависьповинна мати колір різних коричневих відтінків	За п.7, ДФУ, 2.2.2
8	pH	Від 5.5 до 6.5	За п.8, ДФУ, 2.2.3 потенціометрично
9	Втрата в масі при висушуванні	Не більше 3.5%	За п.9 ДФУ, вид. 1, р. 2.2.32
10	Специфічна нешкідливість	Препарат має бути нешкідливим	За п.10 АНД
11	Мікробіологічна чистота	Біфікол не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, плісняви та дріжджоподібних грибів	За п.11 ДФУ, доп. 1, р. 2.6.12, р. 2.6.13

Закінчення таблиці 8.2

12	Специфічна активність - визначення кількості живих *Bifidobacterium bifidum* і *Escherichia coli* в 1 дозі препарату; - визначення активності кислотоутворювання препарату	В одній дозі препарату повинно міститися не менше 10^7 живих *Bifidobacterium bifidum* та не менше 10^7 живих *Escherichia coli.* Показник активності кислотоутворення не нижче 90 °Т	За п.12 АНД За п.12.1 АНД За п.12.2 АНД
13	Герметичність	Флакони з Біфіколом мають бути герметичними	За п. 13 АНД
14	Зберігання	Зберігати у сухому, захищеному від світла місці при температурі від 2 до 8 ºС, у недоступному для дітей місці.	Згідно інструкції до застосування
15	Термін придатності	Термін придатності – 1 рік.	Згідно інструкції до застосування

Методи контролю

Біфікол

1. Опис.

Порошок (кристалічна або пориста маса) різних відтінків коричневого кольору зі специфічним запахом і смаком. Визначають візуально та органолептично.

2. Ідентифікація

Bifidobacterium bifidum - грампозитивні, нерухливі поліморфні палички з біфуркацією на одному або двох кінцях, довжина становить 4-5 мкм, розташовуються у вигляді скупчень або окремих клітин. Належить до облігатних анаеробів. На напіврідких середовищах колонії біфідобактерій мають форму дрібних «цвяхів», «крихток», «ниток» білого кольору.[48]

Escherichia coli - дрібні грамнегативні палички (0,5*2,0 мкм), аспорогенні, переважно рухливі, властивий широкий спектр ферментативної активності. [59] На агаризованих середовищах утворюють плоскі опуклі каламутні з рівними або трошки хвилястими краями колонії або сухі плоскі колонії з нерівними краями. У рідких середовищах ростуть рівномірно, що призводить до помутніння середовища і утворення осаду. На середовищі Ендо формуються колонії малинового кольору з металевим блиском або без нього; на середовищі ЕМС (Левіна) вони мають темно-фіолетовий колір з металевим блиском або без нього; на середовищі Плоскірєва вони є червоними з жовтим відтінком. [42]

3. Однорідність маси

Припустиме відхилення 10 %. Визначають згідно ДФУ 2.9.5.

4. Маса вмісту контейнера

0,5 г. Визначають зважуванням.

5. Розчинність

При контакті з водою утворюється гомогенна завись коричнувато-бежевого кольору. Визначають візуально.

6. Прозорість

Завись має бути не прозорою. Визначають візуально.

7. Кольоровість

Завись повинна мати колір різних коричневих відтінків. Визначають візуально.

8. pH

Від 5.5 до 6.5. Визначають згідно ДФУ, вид.1, р.2.2.3., потенціометрично.

9. Втрати в масі при висушуванні

Становлять не більше3.5 %. Визначається згідно з ДФУ, вид.1, р.2.2.32

10. Специфічна нешкідливість

Препарат має бути нешкідливим для 5ти мишей за введенні його перорально в кількості однієї дози. Тварини мають залишитися живими та не втратити у масі. [62]

11. Мікробіологічна чистота

Визначається згідно ДФУ, доп. 1, р. 2.6.12, с.37, р. 2.6.13.

Здійснюють посіви на МПА для визначення кількості бактерій (інкубують при 30–35 °С). Посіви на середовище Сабуро для визначення загальної кількості грибів (при 25 ° С).

Здійснюють посів на середовищі Чапман агар для виявлення *Pseudomonas aureginosa* та *Staphylococcus aureus*. Інкубують при 30–35 ° С протягом 18–24 год.

12. Специфічна активність.

Специфічна активність пробіотика визначають за кількістю життєздатних клітин *Bifidobacterium bifidum* та *Escherichia coli* в одній дозі Біфіколу та за активністю кислотоутворення. В одній дозі пробіотика повинно бути не менше 10^7 життєздатних клітин *Bifidobacterium bifidum* та не менше 10^7 життєздатних клітин *Escherichia coli*. Показник активності кислотоутворення Біфіколу повинен становити не менше 90 ° Т. [62]

12.1 Визначення кількості живих *Bifidobacterium bifidum* в одній дозі препарату.

Визначення кількості живих *Bifidobacterium bifidum* в одній дозі Біфіколу проводять на 3х зразках препарату від кожної серії.

Кількість живих *Bifidobacterium bifidum* в одній дозі пробіотика перевіряють одночасно з робочим стандартним зразком (РСЗ) Біфіколу. Робочий стандартний зразок Біфіколу – висушена завись біфідобактерій *B.bifidum №1* та *Escherichia coli M 17* по 5 доз у флаконах та містить 10^7 живих мікробних клітин в одній дозі.

Здійснюють десятикратні розведення та відповідно засівають на середовище Блаурока. Підрахунок колоній здійснюють за допомогою лічильника колоній мікроорганізмів «Colony Star».[62]

Аналогічно визначається кількість живих клітин *Escherichia coli* в одній дозі препарату за допомого висіву на середовище Ендо.

12.2. Визначення активності кислотоутворення препарату.

Активність кислотоутворення пробіотика визначають титрометричним методом, вирощуючи *B.bifidum* на середовищі Біфідум або Блаурока.

До біомаси, що ліофілізована у флаконі, додають середовище Біфідум 1 мл на дозу препарату. Інкубують протягом 72 год за температури 37 ^{0}С. Після цього визначають кислотність у кожній пробірці.

10 мл суспензії вносять в стакан на 50мл та титрують 0,1 М розчином NaOH до pH 8,5±0,5.Контроль pH здійснюють потенціометрично.

Кислотність у градусах Тернера визначають за формулою:

$$^{o}T = V*K*10$$

де V – об’єм 0,1 М гідроксиду натрію, використаний на титрування, в мілілітрах; К – коефіцієнт поправки до титру 0,1 М розчину гідроксиду натрію. [62]

РОЗДІЛ 9. Основні післяферментаційні процеси

9. 1. Обгрунтування стадій виділення і очищення Біфіколу

Після культивування, клітини бактерій концентруються за допомогою процесу центрифугування. Перед процесом заморожування до відділеної біомаси додають захисне середовище. Після того як біомасу змішають з захисним середовищем відбувається процес заморожування після якого відбувається процес сублімаційного сушіння. Після видалення з сушарки ліофілізований матеріал подрібнюють до порошку, після подрібнений матеріал просіюють. Далі відбувається фасування та пакування продукту. [9]

9.1.1. Відділення біомаси від культуральної рідини

Щоб відділити супернатант від біомаси, що і є основною речовиною необхідною для подальшого процесу отримання ліофолізату. Існує декілька способів відділення біомаси: фільтрація, центрифугування, сепарування. [38]

Для відділення біомаси від культуральної рідини вибираємо процес центрифугування.

Центрифугування – процес розділення рідких неоднорідних систем у полі дії відцентрових сил. Центрифуги використовують для для розділення суспензій на рідку та тверду фази, що містять мікроорганізми, ферменти, амінокислоти та інші продукти біосинтезу.

Головна перевага центрифуг – висока продуктивність та компактність обладнання. Центрифугування здійснюють методами відцентрового фільтрування та осаджуування залежно від властивостей дисперсних систем. Центрифуги підрозділяють: осаджувальні, фільтруючі, комбіновані, сепаратори. [38]

9.1.2. Змішування біомаси з захисним середовищем

Змішування біомаси з захисним середовищем здійснюється перед заморожуванням та ліофілізацією напівфабрикату.

Задля мінімізації загибелі клітин та щоб максимізувати кількість живих клітин, при температурних коливаннях та зміні агрегатного стану рідини в середині клітини під час заморожування і ліофілізації застосовують кріопротектори, що пригнічують швидкість росту льоду шляхом збільшення в'язкості розчину та утримання аморфної структури льоду в безпосередній близькості від клітини та ліопротектори, що стабілізують структуру ліпідного бішару клітинної мембрани за відсутності води. Широко використовуваними кріо- та ліопротекторами є вуглеводи та пептиди. [9]

Для здійснення подальшого роцесу ліофілізації будемо застосовувати сахарозо-желатинове захисне середовище. [62]

Сахароза та компоненти молочного середовища створюють захисне покриття, яке допомагає зберегти структуру та життєздатність клітин під час сублімаційного сушіння.

Сахароза має властивість знижувати водну активність середовища, що допомагає уникнути утворення льодових кристалів під час заморожування і сушіння. Це допомагає уникнути пошкодження клітин.

9.1.3. Сушіння

Для того щоб перевести біомасу в суху форму необхідно її висушити. Ліофілізаційне сушіння – це процес, у якому вода сублімується шляхом прямого переходу води з твердого стану (лід) у пару, таким чином опускаючи рідкий стан, а потім десорбує воду з «сухого» шару. Ліофільна сушка відбувається в три фази: заморожування; первинна сушка (сублімація); вторинна сушка (адсорбція). [41]

Заморожування препарату буде здійснюватись: за температури -60 ^{0}C протягом 60 год. Сушіння буде відбуватись за температури – 34 ^{0}C. [62]

9.1.4. Подрібнення

Подрібненням називають процес руйнування твердого матеріалу під дією зовнішніх сил. Всі подріблювальні машини класифікуються за ступенем подрібнення. *Щокові дробарки* застосовуються при грубому і середньому дробленні. *Валкові дробарки* застосовуються для середнього і тонкого дроблення. *Молоткові дробарки* – для дрібного і тонкого подрібнення. [49]

Процес подрібнення допомагає стандартизувати розмір частинок ліофілізованого матеріалу, що дозволяє однорідно змішувати його з іншими компонентами для отримання однорідної суміші. Дрібно подрібнені частинки ліофілізованого матеріалу краще розчиняються у рідині, що полегшує їхнє використання в процесах виготовлення пробіотичного продукту.

Процес подрібнення будемо здійснювати на валковій дробарці. Валкова дробарка – установка для дроблення матеріалів валками, що обертаються назустріч один одному. Переваги валкових дробарок – простота конструкції, простота в обслуговуванні, можливість дроблення вологих матеріалів. Недоліки – невисока продуктивність, великий абразивний знос робочих поверхонь валків.[29]

9.1.5. Просіювання

Після стадії подрібнення продукт просіюють через металеві сита. Просіювання допомагає видалити домішки ліофілізованого матеріалу, забезпечуючи чистоту та однорідність кінцевого продукту. Через просіювання можна досягти більшої однорідності і меншої грубості в кінцевому продукті, що важливо для консистенції та якості пробіотичного продукту.

9.1.6. Фасування та пакування

Ліофілізований порошок розсипають у флакони. Наповнення флаконів відбувається в асептичних умовах, за допомогою автоматизованих систем наповнення, по 5 доз у флаконі. Флакони закупорюють під вакуумом або в течії інертного газу.

Маркують та упаковують по 10 флаконів у пачці. Фасування та пакування буде здійснюватись автоматично. Зберігають у сухому, захищеному від світла місці при температурі від 2 до 8 ºС. [27]

9.2. Складання узагальненої процесуальної схеми із позначенням обраних післяферментаційних етапів.

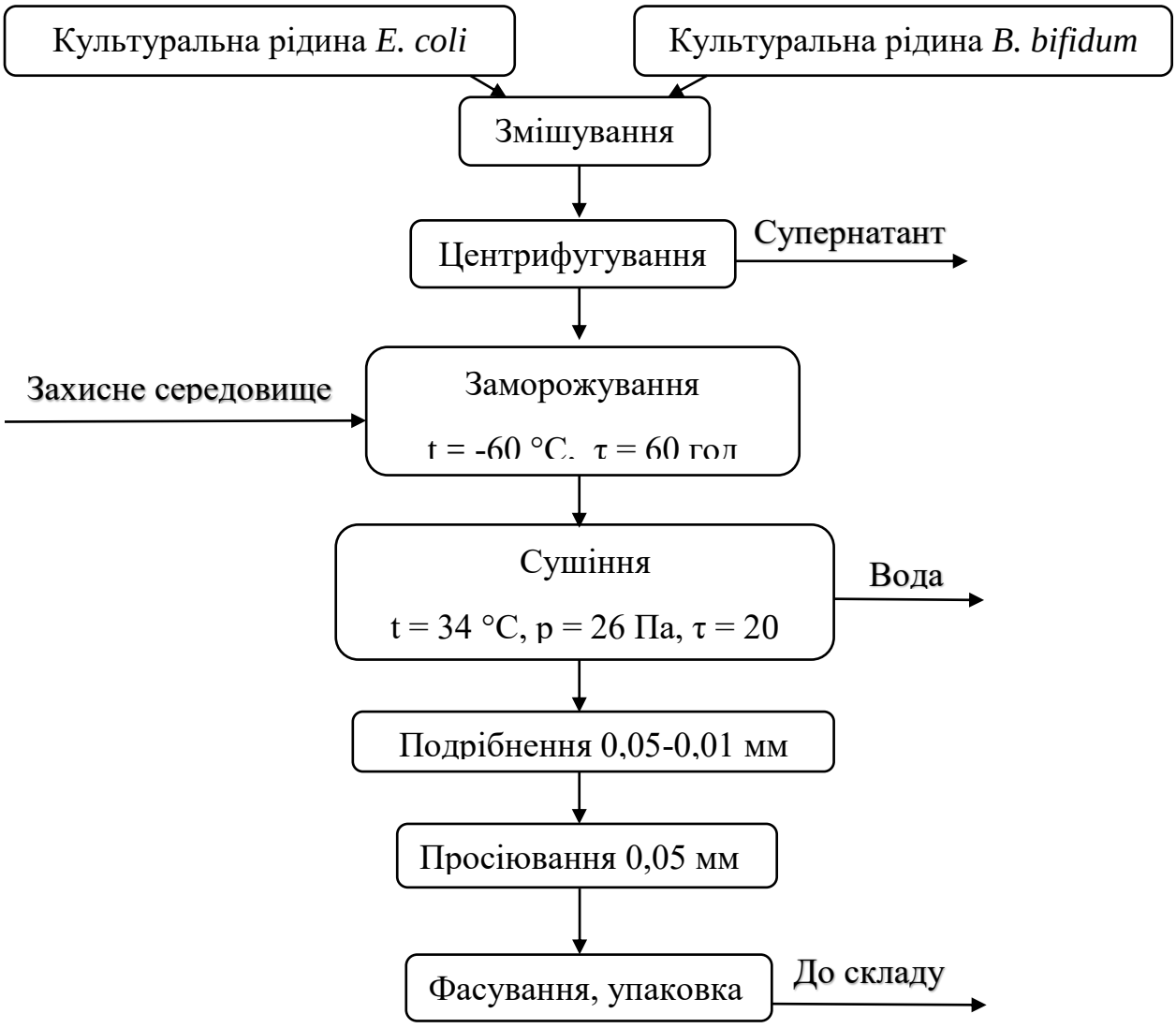

Рис. 9.1. Схема післяферментаційних етапів отримання препарату Біфікол

9.3. Розрахунок матеріальних потоків післяферментаційних процесів.

Річна потужність підприємства $G_{нт}$ = 440 кг/рік

Кількість робочих днів у рік $T_{рд}$ = 150 днів

Кількість сухих речовин в готовому продукті, частка (0,9-0,95) $СР_{гп}$ = 0,95

Час виробничого циклу $T_{ц}$ = 31 год

Коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій), 1,1-1,5 K_1 = 1,1

Концентрація біомаси в КР $X_{кр}$ = 6 г/л

Втрати при виділенні

Втрати продукту при центрифугуванні КР, частка $E_{цф}$= 0,05

Втрати продукту при сушінні осаду, частка $E_{сш}$= 0,1

Втрати продукту при подрібненні, просіюванні, частка $E_{пд}$= 0,02

Втрати продукту при фасуванні, частка $E_{фс}$= 0,01

Сумарні втрати при виділенні готового продукту, частка $E_{св}$ =0,18

Кількість партій продукту

Розрахуємо кількість ферментаційних циклів на рік :

$N_{цк} = 24 \times К1 \times T_{рд}/T_{цф} = 24 \times 1,1 \times 150 / 31 = 128$ циклів

Кількість продукту за цикл, кг /цикл:

$G_{цк} = G_{гп}/N_{цк} = 440 / 128 = 3,4$ кг/цикл

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

$V_{кр} = G_{цк} \cdot СР_{гп}/(X_{кр} \cdot (1-E_{св})) = 3,4 \times 0,95/(6 \times (1-0,18)) = 0,66$ $м^3$

Визначаємо робочий об'єм ферментера, $V_{рф}$, $м^3$

$V_{рф} = V_{кр} /(1-E_{кр}) = 0,66/(1-0,18) = 0,8$ $м^3$

Приблизний геометричний об'єм ферментера, $м^3$

$V_{пф} = V_{рф}/К_з = 0,8/0,8 = 1,00$ $м^3$

З таблиці вибираємо найближчий за об'ємом ферментер, $V_{гф} = 1,00$ $м^3$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення $К_{уз}$,частка

$К_{уз} = V_{рф}/V_{гф} = 0,8/1,00 = 0,8$

Стадія ТП. Виділення, очищення та отримання готової продукції

Для визначення об’ємних потоків слід скористатись перерахунками за формулою

$V = G·1000/ρ$, $м^3$, де G – маса продукта в кг; ρ – густина продукту, кг/$м^3$.

1. Маса абсолютно сухої біомаси (АСБ) в культуральній рідині становить, кг

$G_{асб} = V_{кр}·X_{кр} = 0,6·6 = 3,6$ кг

2 . Маса КР, що йде на подальшу переробку складає

$G_{кр} = V_{кр}·ρ_{КР} = 0,6· 1050 = 630$ кг , де густина КР $ρ_{КР} = 1010…1100$ кг/$м^3$

3. Маса води в КР становить $Gвкр = G_{кр} – G_{аср} = 630 -3,6 = 626,4$ кг

1. Центрифугування культуральної рідини

Втрати продукту при центрифугуванні $E_{цф}=0,05$

Вологість осаду $W_{ос}$= (65-85%,) загальна кількість вологого осаду, що видаляється з Vкр складе

$Gосб = G_{асб}/(1-W_{ос}) = 3,6 /(1-0,7) = 12$ кг

Маса розчиненої абсолютно сухої біомаси з врахуванням втрат

$G_{ас1} = G_{ас} (1- E_{цф})= 3,6 (1-0,05) = 3,42$ кг

Кількість води у фільтраті, кг $G_{вф} = G_в(1-E_{цт}) - G_{асб}(W_{ос}/(1-W_{ос})) = 626,4*(1-0,05) – 3,6(0,7/(1-0,7)) = 586,68$ кг

Кількість фільтрату після центрифугування,

$G_{фт} = G_{ас} + G_в = 3,42+586,68 = 590$ кг

Втрати $B_{цф} = G_{кр}-G_{фт} - G_{осб} = 630-590-12 = 28$

Густина фільтрату $\rho_ф = 1010$ (1010… 1050 кг/м^3)

Об'єм фільтрату $V_{фт} = G_{фт}\cdot 1000/\rho_ф = 590*1000/ = 862$ л

Сушіння біомаси

Маса після сушіння з врахуванням втрат $E_{сш} = 0,1$ та кінцевої вологості $СР_{гп}$

$G_{сш} = G_{асфф}(1-E_{сш})/СР_{гп} = 3,42*(1-0,1)/0,95 = 3,24$ кг

Втрати $B_{сш} = G_{осф}\cdot E_{сш} = 3,42\cdot 0,1 = 0,342$ кг

Маса видаленої вологи, кг

$Wв = G_{осф} - G_{сш} - B_{сш} = 3,6 – 3,24 – 0,342 = 0,018$ кг

Подрібнення, просіювання

Кількість сухої біомаси з врахуванням втрат $E_{пд} = 0,02$

$G_{пд} = G_{сш}(1-E_{пд}) = 3,24*(1-0,02) = 3,18$ кг

Втрати $B_{пд} = G_{сш}-G_{пд} = 3,24 -3,18 = 0,06$ кг

Фасування готового продукту

Маса 1 флакона $G_{фл1} = 0,5$ кг

Кількість розфасованого готового продукту з врахуванням втрат $E_{фс} = 0,01$

$Gфл = G_{гп}(1-E_{фс}) = 3,18*(1-0,01) = 3,15$ кг

Кількість флаконів N

$N = G_{фл}/G_{фл1} = 3,15/0,5 = 6,0$

ТАБЛИЦЯ МАТЕРІАЛЬНОГО БАЛАНСУ ВИДІЛЕННЯ ПРОБІОТИКА БІФІКОЛ НА ОДНУ ФЕРМЕНТАЦІЮ (ПАРТІЮ)

Таблиця 9.1

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, дм³	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, дм³
1	*2*	*3*	*4*	*5*
1.	Центрифугування культуральної рідини, кг (л)			
	Густина КР, $\rho_{кр}$	1050 кг/м^3	КР на фільтрацію	660 (л)
	КР на центрифугування	630	Фільтрат	590
			Вологий осад біомаси (70%)	12
	Втрати,частка	0,05	Втрати	28
	Всього:	630	Всього:	630
2.	Сушіння вологого осаду, кг			
	Вологий осад	12	Сухий фермент (5% вологи)	11,4
			Видалена волога, кг	0,258
	Втрати	0,10	Втрати	0,342
	Всього:	12	Всього:	12
3.	Подрібнення, просіювання біомаси, кг			
	Суха біомаса	11,4	Суха біомаса	11,2
	Втрати, частка	0,02	Втрати	0,2
	Всього:	11,4	Всього:	11,4
4.	Фасування, упакування готового продукта, кг			
	Готовий продукт до фасування в ум.од	11,2	Готовий продукт до фасування	11
	Флакони (0,5 кг)	22	Кількість флаконів	22
			Запас до іншої партії	0
	Втрати,частка	0,01	Втрати	0,2
	Всього:	11,2	Всього:	11,2

РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля

10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва пробіотика Біфікол на місця утворення твердих, рідких та газоподібних відходів

Таблиця 10,1

Відходи, що утворюються на проєктованому виробництві

Тип відходів	Назва відходів	Речовина, що входить до складу відходів	Стадія виробництва
Газоподібні	Відпрацьований газ з ферментера та інокуляторів	Діоксид Карбону, клітини бактерій	Виробничий біосинтез та вирощування посівного матеріалу
	Відпрацьоване повітря після сушки	Частки сухої біомаси	Післяферментаційні процеси виділення
Рідкі	1%-ий розчин хлорного вапна	суміш з гіпохлорит , гідроксид та хлорид кальцію	Обробка приміщення
	0,2%-ий розчин засобу «Дезактин»	ПАР, дихлорантин, диметилгі дантоїн	Обробка приміщення та обладнання

Закінчення таблиці 10,1

	1%-ий розчин засобу «Санокварт»	ЧАС	Обробка обладнання
	0,5%-ий розчин засобу «UNI-1»	ПАР	Миття приміщення
	1%-ий розчин засобу «SUPRA»	ПАР	Миття приміщення
	2%-ий розчин каустичної соди	Натрію гідроксид	Миття обладнання
	2%-ий розчин кальцинованої соди	Натрію карбонат	Миття обладнання
	Супернатант після центрифугування	Залишки біомаси	Післяферментаційні процеси
Тверді	Тара для мийних засобів	Поліетилен	Санітарна підготовка виробництва
	Пакувальні матеріали	Поліпропілен, папір	

10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Рідкі відходи виробництва становлять основну кількість. Відпрацьовані залишки миючих засобів після миття та супернатаннт після центирифугування – рідкі відходи виробництва. Для знешкодження відходів використовуються аеротенки. Активний мул використовують в аеротенках. Аеротенк— це залізобетонний канал завглибшки 4—5 м, завширшки 3—11 м (залежить від потужності), завдовжки 50—150 м (від ступеня забрудненості стічних вод). [22]

Стічну воду подають, потім вона контактує з регенерованим активним мулом, переміщується й аерується повітрям, яке подається в розміщений на дні аеротенка розпилювач повітря. Після біологічного очищення, яке триває 4—48 год., вода перетікає у відстійник, в якому активний мул осідає, й основну його кількість — "зворотний мул" — за допомогою насоса подають вгору аеротенка, що зветься "регенератором", де за інтенсивної аерації відбувається відновлення якості активного мулу: він перетравлює сорбовані раніше зі стічних вод органічні сполуки, особливо ті, що розкладаються повільно, готується до інтенсивного очищення нової порції свіжої стічної води 2. [22]

Надлишок активного мулу подають на стабілізацію, ущільнення, зневоднення, складування й на подальше використання, наприклад, для одержання біогазу, добрив тощо.

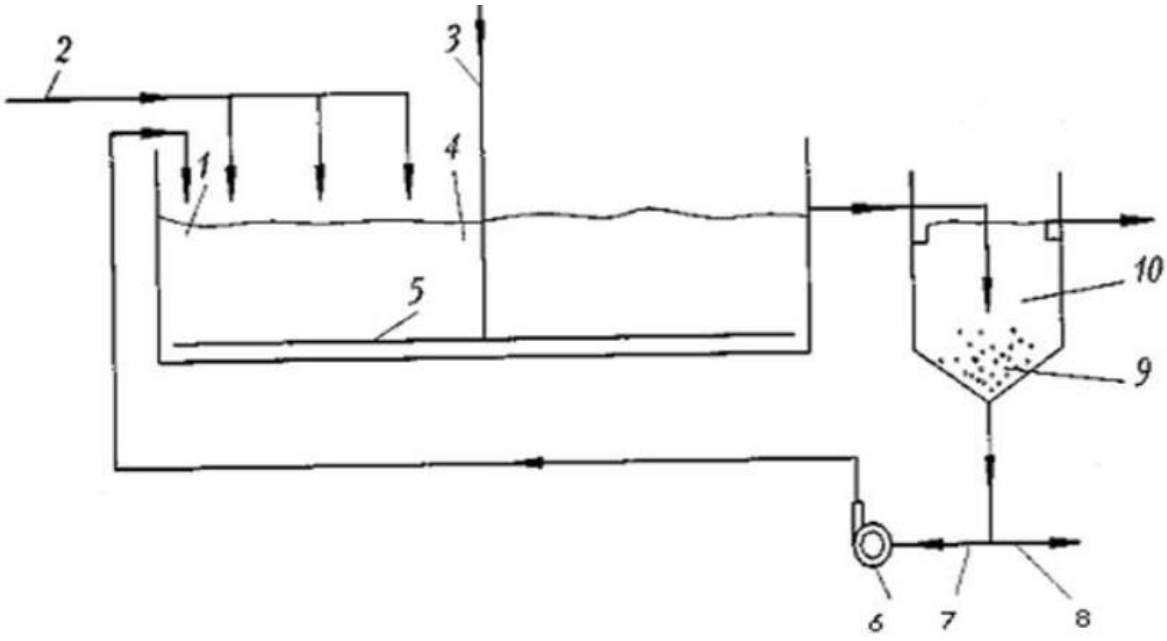

Рис.10.1. Схема аеротенку:

1 — регенератор; 2 — стічна вода; 3 — повітря; 4 — аеротенк; 5 — пристрій для розпилювання повітря; 6 — насос; 7 — зворотний мул, 8 — надлишковий мул; 9 — осад активного мулу; *10* – відстійник

10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Тверді відходи на підприємстві:

- бруд на фільтрах;
- непридатні хімічні реактиви (агаризовані середовища з чашок Петрі після мікробіологічного контролю, випадково розсипані солі);
- пакувальні матеріали (картон, полівінілхлорид, поліетилен):
- скло (у результаті склобою лабораторного посуду);

Тверді відходи на фільтрах. На фільтрах можуть залишитись клітини продуценту. Використані фільтри піддати термічній обробці в автоклаві і передати організаціям, які їх приймають на утилізацію.

Непридатні хім. реактиви. Потрібно зберігати окремо в спеціально відведеній і промаркованій шафі, та передати спеціальним організаціям на утилізацію.

Інші відходи. Варто складати в окремі контейнери (мукулатура, поліетилен, скло тощо) та передавати на переробку до пунктів прийому вторсировини.

10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Здійснювати знешкодження газоподібних відходів можна за допомогою біологічного скрубера. Забрудненний газ надходить у скрубер, де відбувається процес адсорбції очищається від домішок та після виходить в атмосферу. Утворена стічнавода надходить у аеротенк для очищення. [28]

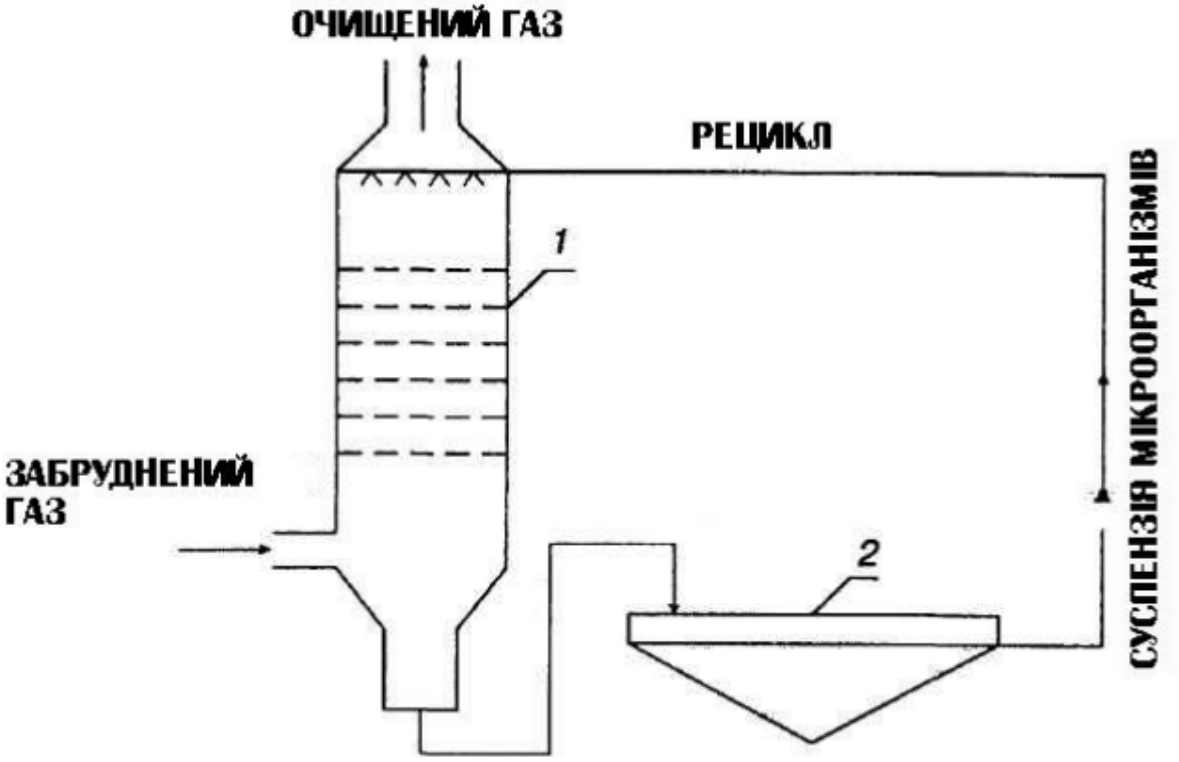

Рис. 10.2. Схема біологічного скрубера [28]

10.2.4. Заходи щодо зменшення об’ємів відходів

Препарат Біфікол застосовують при порушеннях біоценозу кишечнику різної етіології. Виробництво препарату характеризується невеликим об’ємом відходів за цикл.

Відповідно до проаналізованих даних. Накопичення рідких відходів здійснюються на етапі санітарної підготовки виробництва та післяферментаційних процесах. Утилізацію рідких відходів здійснюють за допомогою аеротенка. Для утилізації газоподібних відходів застосовують біологічний скрубер. Тверді відходи відправляють на утилізацію.

Отже, виробництво Біфіколу має невелку кількість відходів та є безпечним.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. A repeated batch process for cultivation of Bifidobacterium longum / S. L. Her et al. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2004. Vol. 31, no. 9. P. 427–432. URL: https://doi.org/10.1007/s10295-004-0164-3
2. Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., & Bottazzi, V. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of microbiology*. 2000, *50*(2), 117-132.
3. *Bifidobacterium bifidum.* Gram stain [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://textbookofbacteriology.net/normalflora.html
4. DEZ-1 [Електронний ресурс]: https://primaterra.ua/ua/p1761895656-kontsentrat-dlya-dezinfektsii.html
5. Faraki A, Noori N, Gandomi H, Banuree SAH, Rahmani F. Effect of *Auricularia auricula* aqueous extract on survival of *Lactobacillus acidophilus La-5* and *Bifidobacterium bifidum Bb-12* and on sensorial and functional properties of synbiotic yogurt. *Food Sci Nutr*. 2020 Jan 20;8(2): 1254-1263. doi: 10.1002/fsn3.1414.
6. Glycolysis / Gluconeogenesis - Bifidobacterium bifidum S17. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.genome.jp/pathway/bbi00010
7. High Concentration Cultivation of Bifidobacterium bifidum in a Submerged Membrane Bioreactor / S. G. Kwon et al. *Biotechnology Progress*. 2006. Vol. 22, no. 6. P. 1591–1597. URL: https://doi.org/10.1021/bp060236s
8. Hoover D. G. Bifidobacterium. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2014. P. 216–222. doi:10.1016/b978-0-12-384730-0.00033-1
9. K. Fenster et al. The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach *Microorganisms*. 2019. Vol. 7, no. 3. P. 83. DOI:10.3390/microorganisms7030083
10. Kumar, V., Naik, B., Kumar, A. et al. Probiotics media: significance, challenges, and future perspective - a mini review. Food Prod Process and Nutr. 2022.Vol. 4, no. 1. https://doi.org/10.1186/s43014-022-00098-w

11. Lu W, Pei Z, Zang M, Lee YK, Zhao J, Chen W, Wang H, Zhang H. Comparative Genomic Analysis of *Bifidobacterium bifidum* Strains Isolated from Different Niches. *Genes* (Basel). 2021 Sep 25;12(10):1504. doi: 10.3390/genes12101504.
12. S. M. Hussain.Bioprocess Development for Enhanced Production of Probiotic Bifidobacterium bifidum. *Current Science*. 2020, 118(2): 280. doi: 10.18520/cs/v118/i2/280-285
13. Shigwedha N., Ji L. Bifidobacterium in Human GI Tract: Screening, Isolation, Survival and Growth Kinetics in Simulated Gastrointestinal Conditions. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. 2013. doi:10.5772/50457
14. Stavropoulou E, Bezirtzoglou E. Probiotics in Medicine: A Long Debate. *Front Immunol*. 2020 Sep 25. doi: 10.3389/fimmu.2020.02192.
15. SUPRA [Електронний ресурс]: https://primaterra.ua/ua/p4068489-supra-12kg-schelochnoe.html
16. UNI-1 [Електронний ресурс]: https://primaterra.ua/ua/p1543484022-universalnoe-moyuschee-sredstvo.html?source=merchant_center&gad_source=1&gclid=CjwKCAjwoa2xBhACEiwA1sb1BD6_q31Mh5KbHHYMRoDTb1SqVvxtsrYFaaQ4YhT2Kug3Lh9c5qGyCxoCWT8QAvD_BwE
17. Аніосепт актив [Електронний ресурс]: https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/aniosept-aktiv-ua-instruktsiya/
18. Аніосепт актив [Електронний ресурс]: https://vdsstomat.com.ua/product/aniosept-aktiv-ua-1-kg/
19. Апарати мікробіологічної промисловості [Текст]: навч. посібник/ І. П. Данилов, С. І. Самійленко. – Харків : НТУ «ХПІ», 2008. - 272 с.

20. Балаклієц Н.І. Загальна мікробіологія.: Навч. посібник., Харківський мед. ун-т. У. Основа, 2001 – 258с.
21. Балон [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://ballongaz.com.ua/p12193426ballonazotnyj40l.html?source=merchant_center
22. БІОЛОГІЧНЕ ОЧИЩЕННЯ СТІЧНИХ ВОД. ЗМІСТ І МЕЖІ ЗАСТОСУВАННЯ БІОЛОГІЧНОГО ОЧИЩЕННЯ ВОДИ Лекція № 5. [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://elib.lntu.edu.ua/sites/default/files/elib_upload/%D0%93%D0%BE%D1%82%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D0%B9%20%D0%91%D0%BE%D0%BD%D0%B4%D0%B0%D1%80%D1%87%D1%83%D0%BA/page7.html
23. Біомой [Електронний ресурс]: https://hlorka.in.ua/ua/p607423965-biomoj.html
24. Біореактор BLBIO -100SJA об'ємом 100 л [Електронний ресурс] // Режим доступу: http://www.blbio.com/en/Product_Detail.aspx?id=53
25. Біореактор BLBIO-10SJA об'ємом 10 л [Електронний ресурс] // Режим доступу: http://www.blbio.com/en/Product_Detail.aspx?id=58
26. Біфікол порошок д/ор. р-ну по 5 доз №10 у флак [Електронний ресурс].Режим доступу: https://tabletki.ua/uk/%D0%91%D0%B8%D1%84%D0%B8%D0%BA%D0%BE%D0%BB/22123/
27. БІФІКОЛ® [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[9284]
28. В.О. Красінько Основи екобіотехнології: Конспект лекцій для студ. напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2011. – 144 с.

29. Валкова дробарка [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://mcet.com.ua/dictionary/valkova-drobarka/
30. Векірчик К. М. Мікробіологія з основами вірусології: Підручник. – К.: Либідь, 2001р. – 312 с.
31. Вінсепт [Електронний ресурс]: https://hlorka.in.ua/ua/p1036695189-vinsept-bez-spirtovaya.html
32. Газовий фільтр [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://akvateh.dp.ua/ua/p1248439582-filtr-gazovyj-kompaktnyj.html
33. Дезактин [Електронний ресурс]: https://hlorka.in.ua/ua/p276022596-dezaktin.html?utm_source=google.pm&utm_medium=cpc&utm_campaign=performance_max_ru&utm_content=&utm_term=&gad_source=1&gclid=CjwKCAjwxLKxBhA7EiwAXO0R0J_cpZ6IalHAvSZYI1CBJmv_bHCMcvRPezfO-ymnu6kP0htU-SOzWxoCZycQAvD_BwE
34. Деконтадез [Електронний ресурс]: https://hlorka.in.ua/ua/p692176337-famidez-dekontadez.html
35. Ємність для зберігання [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://prom.ua/ua/p1151274414-yemnist-tehnologichna-nerzhaviyuchoyi.html?&primelead=MS4wNjI1
36. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник/ М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. - 252 с.
37. Загальна мікробіологія і вірусологія: [Електронний ресурс] лабораторний практикум для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної форми навчання. / уклад. Т.П. Пирог, Л.В. Ключка. – К.: НУХТ, 2021. – 100 с.

38. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв[Електронний ресурс]: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. – 373 с.
39. Кондуктометричний біосенсор на основі триферментної системи для визначення сахарози / О. О. Солдаткін, В. М. Пєшкова, С. В. Дзядеви, Г. В. Єльська // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 1. — С. 116-122. — Бібліогр.: 20 назв. — укр.
40. 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.
41. ЛІОФІЛІЗАЦІЙНЕ СУШІННЯ [Електронний ресурс]: https://bmholod.com.ua/solution/ustatkuvannya-dlya-sushinnya/liofilizovane-sushinnya/
42. Модуль 3. Частина 2. Родина кишкових бактерій : метод. вказ. з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія та імунологія з мікробіологічною діагностикою" до практичних занять для студентів-бакалаврів III–IV курсу за спеціальністю "Лабораторна діагностика" / упор. В.В. Мінухін, Н.І. Коваленко, Т.М. Замазій. – Харків : ХНМУ, 2014. – 44 с.
43. МОЗ України від 14.12.2001 №502 [Електронний ресурс]: https://zakononline.com.ua/documents/show/41907___487517
44. Насос [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://dosingtech.com.ua/uk/product/vidtsentrovij-himichnij-nasos-dr015pdt11lie/
45. Патент № 107738. Композиція інгредієнтів для культивування бактерій роду Bifidobacterium // Крупицька Л. О, Капрельянц Л. В, Труфкаті Л В.

46. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник –2-е вид., доп і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632с.
47. Про погодження методик визначення біологічних речовин: МОЗ України від 28.01.2004 №4 / ZakonOnline – 2004. Режим доступу : https://zakononline.com.ua/documents/show/127033___127033
48. Про погодження методик визначення біологічних речовин: МОЗ України від 28.01.2004 №4 / ZakonOnline – 2004. Режим доступу : https://zakononline.com.ua/documents/show/127033___127033
49. Процеси і апарти харчових виробництв: Підручник / За ред. професора І. Ф. Малежика. – К.: НУХТ , 2003. – 400 с.
50. Реактор-змішувач для приготування композиції А [Електронний ресурс] // Режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php
51. Реактор-змішувач для приготування композиції А [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://energoprom.in.ua/ua/p1151904722-zmishuvach-obyemom-100.html
52. Реактор-змішувач для приготування композиції В [Електронний ресурс] // Режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php
53. Реактор-змішувач для приготування композиції В [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://perryvidex.eu/product/ltr-mm-x-mm-v-agit-L1417-01
54. Санокварт [Електронний ресурс]: https://www.systopt.com.ua/item-sanokvart-analog-klinisept
55. СТ – Н МОЗУ 42 – 4.0:2020 Лікарські засоби. Належна виробнича практика. – К. Міністерство охорони здоров'я України, 2020

56. Старовойтова С.О., Волошина І.М. Технологія пробіотиків і вакцин [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. і заоч. форм навч. / С.О. Старовойтова, І.М. Волошина – К.: НУХТ, 2020. – 217 с.
57. Статистичний щорічник України 2021 рік. Державна служба статистики України. – Київ 2022. – С. 447 (С. 131) Режим доступу: https://ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2022/zb/11/Yearbook_2021.pdf
58. Сучасні засоби для дезінфекції та гігієни [Електронний ресурс]: https://www.systopt.com.ua/article-sovremennye-sredstva-dlya-dezynfekcyy-y-gygyeny
59. Сучасні напрямки створення та удосконалення пробіотиків [Електронний ресурс] / С. В. Калініченко, О. О. Коротких, І. Ю. Тіщенко // Український біофармацевтичний журнал. - 2016. - № 1. - С. 4-10. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/ubfj_2016_1_3
60. Технологія мікробного синтезу лікарських засобів [Електронний ресурс]: Лабор. практикум для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. і заоч. форм навч. / Л.М. Буценко, С.М. Тетеріна, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 102 с.
61. Технологія пробіотиків: Метод. рекомендації до вивч. дисц. та викон. лаб. та контрол. роботи для студ. напряму 6.051401 «Біотехнологія» заоч. форми навч. / Уклад.: С.О.Старовойтова, І.М.Волошина – К: НУХТ, 2013. – 35 с.
62. Технологія пробіотиків: Підруч./ С. О. Старовойтова, О. І. Скроцька, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирог. – К.: НУХТ, 2012. – 318 с.

63. Ферментер для виробничого біосинтезу [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://bioengineering.ch/lab-pilot/lp351/
64. Фільтр HEPA [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/hepa-filtri-dlya-sistem-ventilyatsiyi.html
65. Хлорамін Б [Електронний ресурс]: https://shop.hlr.ua/ua/hloramin-b-256030.html
66. Хлорне вапно [Електронний ресурс]: https://www.systopt.com.ua/item-xlorne-vapno-hlorku
67. Чухрай І.Л. Оптимізація фармацевтичного забезпечення пробіотиками. Дис. канд. фарм. наук. Львів – 2021. 245 с
68. Ю.М. Пенчук Загальна біотехнологія [Електроний ресурс]: Конспект лекцій для студентів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної та заочної форм навчання / Ю.М. Пенчук. – К.: НУХТ, 2018. – 115 с.

Додаток 1

Наявність у складі середовища нестандартного компонента - кукурудзяного екстракту, забезпечує нестандартність самого середовища, що призводить до короткочасного терміну зберігання кінцевого продукту, а так само супроводжується незадовільними органолептичними властивостями біологічно активних домішок і заквасок.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити композицію інгредієнтів для культивування бактерій роду Bifidobacterium, і ця задача вирішується шляхом додаванням доступної, екологічно чистої, рослинної сировини, при збільшенні строку зберігання середовища з більш високими титрами біомаси бактерій в процесі зберігання.

Поставлена задача вирішена композицією інгредієнтів для культивування бактерій роду Bifidobacterium, що містить стимулятор росту, лактозу, пептон, аскорбінову кислоту, натрій лимоннокислий тризаміщений, калій фосфорнокислий двозаміщений, магній сірчанокислий, агар-агар і воду дистильовану. Як стимулятор росту композиція містить соєву сироватку, при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

соєва сироватка	3-5
лактоза	0,1
пептон	0,1
аскорбінова кислота	0,05
натрій лимоннокислий тризаміщений	0,6
калій фосфорнокислий двоозаміщений	0,2
магній сірчанокислий	0,12
агар-агар	0,25
вода дистильована	решта.

Після вивчення хімічного складу було встановлено, що найбільш повноцінними і придатними для включення у композицію інгредієнтів для культивування бактерій роду Bifidobacterium є зернобобові культури та продукти їх переробки. Вони містять високоякісний білок і, крім того, є джерелом поліненасичених жирних кислот, вітамінів, макро- і мікроелементів, не містять холестерину і твердих жирів. Крім цього, соя та продукти її переробки є джерелами харчових волокон та ізофлавінів, тому вони самі по собі стимулюють ріст нормальної мікробіоти шлунково-кишкового тракту.

Використання запропонованої композиції дозволяє за 16-24 години культивування при 37 °С отримати біомасу біфідобактерій з вмістом життєздатних клітин від $6 \cdot 10^9$ КУО/см^3 до $5 \cdot 10^{11}$ КУО/см^3.

Заявлена корисна модель ілюструється фігурами, де:

фіг. 1 - динаміка росту B.bifidum на лактозному середовищі з додаванням різної масової частки соєвої сироватки;

фіг. 2 - динаміка росту B. longum на лактозному середовищі з додаванням різної масової частки соєвої сироватки;

фіг. 3 - динаміка росту B. adolescentis на лактозному середовищі з додаванням різної масової частки соєвої сироватки;

фіг. 4 - технологічна схема отримання соєвої сироватки.

Було приготовано поживне середовище на основі лактози і соєвої сироватки. Приготування