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 Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus для виробництва Лактіалє»*

Виконав: здобувач__IV__ курсу, групи__2__

_____ПРОНІНА Поліна Едгарівна_____ _____
(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 _____ _____
(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

_____ ПРОНІНА Поліна Едгарівна _____
(прізвище, ім’я, по батькові)
1.Тема роботи**:** __«*Одержання біомаси Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus для виробництва Лактіалє»*_____
керівник роботи __Старовойтова С. О. , доцент, к.б.н._____,
(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 геометричний об’єм ферментера 0,25м^3, коефіцієнт заповнення становить 0,7, цільовий продукт біомаса клітин, виробничий штам *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* PTCC177_____
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)_ характеристика цільового продукту, характеристика біологічного агента, техніко-економічне обгрунтування, обгрунтування вибору технологічної схеми, специфікація обладнання, опис технологічної схеми, контроль виробництва_____
5. Перелік графічного матеріалу. Технологічна схема 1 аркуш формату А2 та апаратурна схема 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
	Розділ 1. Характеристика цільового продукту	01.03.24 - 03.03.24	
	Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	03.03.24 - 04.03.24	
	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування.	04.03.24 - 06.03.24	
	Розділ 4. Біосинтез цільового продукту	06.03.24 - 10.03.24	
	Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	10.03.24 - 14.03.24	
	Розділ 6. Специфікація обладнання	14.03.24 - 16.03.24	
	Розділ 7. Опис технологічної схеми	16.03.24 - 16.04.24	
	Розділ 8. Контроль виробничого біосинтезу	16.04.24 - 25.04.24	
	Розділ 9. Контроль виробництва субстанції	25.04.24 - 30.04.24	
	Розділ 10. Екологізація виробництва	30.04.24 - 28.05.24	

Здобувач _____ ПРОНІНА Поліна
(підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____ СТАРОВОЙТОВА Світлана
(підпис) (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Представлено проект виробництва біомаси *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* для виробництва Лактіалє. На основі аналізу та порівняння потенційних продуцентів пробіотиків, складу поживних середовищ та умов їх культивування було обрано біологічний агент – *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus PTCC177*. Розрахована потужність виробництва становить 20 $м^3$/рік культуральної рідини або 93 кг біомаси клітин.

Технологічна схема виробництва *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* PTCC177 включає допоміжні роботи (приготування та стерилізація аераційного повітря (для підтримки надлишкового тиску в апараті, а також перекачування посівного матеріалу, через трубу претискання, з інокулятору у виробничий фермнетер), а також титрувальних агентів, та приготування і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (2 стадії підготовки посівного матеріалу (у коблах на качалках та інокуляторі) та біосинтез у ферментері об'ємом 0,25$м^3$ (коефіцієнт заповнення 0,7)). Тривалість культивування 48 год., температура 37°С. Культивування припиняють за досягнення в культуральній рідині біомаси 5,1 г/л. Наведені методи визначення активності ферментів. Графічна частина роботи присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем виробництва.

Обсяг кваліфікаційної роботи – 100 сторінок. Містить 9 рисунків, 20 таблиць. Робота виконана на основі 85 літературних джерел та технологічної схеми формату А2 та апаратурної схеми формату А1.

Ключові слова: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, пробіотик.

ABSTRACT

This paper presents a project for the production of biomass from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* for the manufacture of Lactiale. Based on the analysis and comparison of potential probiotic producers, the composition of nutrient media, and cultivation conditions, the biological agent chosen was *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* PTCC177. The calculated production capacity is 20 m³/year of culture fluid or 93 kg of cell biomass.

The technological scheme for producing *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* PTCC177 includes auxiliary operations (preparation and sterilization of aeration air to maintain excess pressure in the apparatus, and pumping of inoculum through a compression pipe from the inoculator to the production fermenter, as well as titrating agents, and preparation and sterilization of nutrient media) and the technological process (two stages of inoculum preparation in shaking flasks and the inoculator, and biosynthesis in a fermenter with a volume of 0.25 m³ (filling coefficient 0.7)). The cultivation duration is 48 hours at a temperature of 37°C. Cultivation is stopped when the biomass in the culture fluid reaches 5.1 g/L. Methods for determining enzyme activity are presented. The graphical part of the work is dedicated to developing the technological and apparatus schemes for production.

The volume of the qualification work is 100 pages. It contains 9 figures and 20 tables. The work is based on 85 literary sources and includes a technological scheme of A2 format and apparatus scheme of A1 format.

Keywords: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, probiotic.

ЗМІСТ

ВСТУП..... 7

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА СИМБІОТИКА ЛАКТІАЛЄ..... 9

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ *LACTOBACILLUS BULGARICUS*
..... 12

2.1. Обґрунтування вибору Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus та поживного середовища для його культивування..... 12

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus 16

2.3. Таксономічний статус Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus..... 20

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ 21

3.1.Потреба у симбіотику лактіалє 21

3.2.Розрахунок потужності виробництва..... 23

3.3.Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму Ферментера..... 26

3.4.Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу..... 27

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ *LACTOBACILLUS BULGARICUS* 30

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus..... 30

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus..... 32

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ. 36

5.1. Вибір умов і способу культивування 36

5.2.Вибір типу ферментера..... 37

5.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища..... 38

5.3.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для **39**

***одержання інокуляту в колбах на качалках*..... 39**

5.3.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для **40**

***культивування в інокуляторі об'ємом 30 л*..... 40**

5.3.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для **41**

культивування у ферменері об'ємом 250 л **41**
5.4. Підготовка персоналу 42
5.5. Підготовка обладнання та інвентарю 44
5.6. Підготовка виробничих приміщень 45
5.7. Обгрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря 48
5.8. Обгрунтування стадій виділення і очищення субстанції 50
5.8.1. Відокремлення біомаси (концентрування) **52**
5.8.2 Обгрунтування вибору способу приготування кінцевої форми продукту **53**
5.8.3. Обгрунтування способу подрібнення субстанції та її просіювання **55**
5.8.4. Фасування готової субстанції **56**
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ 57
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ 61
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ 70
8.1. Мікробіологічний контроль 70
8.2. Показники росту і синтезу 72
8.3 Визначення концентрації джерела азоту 72
8.4 Визначення концентрації джерела вуглецю 73
8.5. Карта постадійного контролю 75
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ 79
9.1 Контроль готової субстанції 79
9.2. Визначення вологості готової субстанції 82
РОЗДІЛ 10. ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА 84
10.1 Очищення стічних вод 85
10.1.1 Розрахунок орієнтовного об'єму стічних вод **86**
10.1.2 Середні витрати стічних вод підприємства **87**
10.2. Очищення повітря 88
ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА: 90

ВСТУП

Біотехнології є ключовим і перспективним фактором розвитку світового виробництва, і їх застосовують практично в усіх сферах людської діяльності. Поєднання сучасних технологій і природних ресурсів сприяє покращенню стану навколишнього середовища, зменшенню ризику токсичного забруднення ґрунтів і підземних вод, а також підвищенню ефективності сільського господарства. У промисловості багато старих технологій замінюються новими, які використовують мікроорганізми та їхні промислово значущі метаболіти для досягнення поставлених цілей. Це особливо актуально для харчової промисловості, переробки сільськогосподарських, промислових та побутових відходів, очищення стічних вод, а також виробництва біогазу і добрив [1].

Біотехнології є перспективним напрямком розвитку в Україні завдяки наявній науково-технічній базі. Проте одним з факторів, що стримують розвиток цієї галузі, є нестача модернізованого обладнання. Сучасне обладнання необхідне не лише для проведення досліджень, але й для впровадження нових ідей, таких як покращення стану довкілля та вихід вітчизняної продукції на міжнародний ринок [1].

Пробіотики розглядаються як функціональні інгредієнти, оскільки вони можуть відігравати важливу роль у складі кишкової мікробіоти. Ця група бактерій здатна перешкоджати колонізації патогенних мікроорганізмів у кишечнику, запобігаючи або лікувати такі шлунково-кишкові проблеми, як діарея, синдром подразненого кишечника, запалення кишечника та алергії [2].

Останні дослідження доводять взаємозв'язок між станом кишечника, зокрема браком певних пробіотичних бактерій, та рядом захворювань: депресією, розладами настрою, підвищеною тривожністю, розладами когнітивних функцій тощо [3].

Завдяки здатності впливати на функціонування нервової системи людини, пробіотики отримали додаткову назву – психобіотики. Вони позитивно впливають на психоемоційний стан людини. Багато досліджень підтверджують, що пробіотики знижують рівень тривоги та стресу. Зокрема, тривале вживання пробіотиків допомагає зменшити рівень кортизолу, відомого як гормон стресу [4].

Пробіотики розглядаються як функціональні інгредієнти, оскільки вони можуть відігравати ключову роль у складі кишкової мікробіоти. Ця група бактерій здатна перешкоджати колонізації патогенних мікроорганізмів у кишечнику, запобігаючи або лікувати такі шлунково-кишкові проблеми, як діарея, синдром подразненого кишечника, запалення кишечника та алергії [5].

На даний час фармацевтична промисловість зацікавлена в підвищенні ефективності функціональних дієтичних добавок, спрямованих на профілактику розладів кишкової системи, покращення мікрофлори кишечника та зміцнення імунної системи організму [2].

Сучасні дослідження підтверджують зв'язок між станом кишечника, зокрема, недостатністю певних пробіотичних бактерій, та рядом захворювань, таких як депресія, розлади настрою, збільшена тривожність, порушення когнітивних функцій та інші. Психобіотики, які впливають на настрій, мають антидепресивний ефект, проявляючи зміни в емоційних, когнітивних, системних та нервових показниках. Вони виробляють сотні речовин, які позитивно впливають на мозок [3].

Новизною даної роботи є використання *Lactobacillus delbrueckiisubsp. Bulgaricus* PTCC177*,* який у порівнянні з іншими продуцентами синтезує більшу кількість біомаси за однаковий час. Синтез біомаси *Lactobacillus delbrueckiisubsp. Bulgaricus* PTCC177 становить 5.1 г/л, *Lactobacillus rhamnosus* BRM 029693 – 2.4 г/л та *Lactobacillus acidophilus* DGK – 4,54 г/л. Дані продуценти культивується упродовж 48 год при температурі 37ºС. У ході процесу періодично вмикаємо перемішувальний пристрій.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА СИМБІОТИКА ЛАКТІАЛЄ

Пробіотики, переважно непатогенні мікроорганізми людського походження, що при введенні в адекватних кількостях приносять користь для здоров'я господаря та можуть запобігти або покращити деякі захворювання (Fric, 2007). Згідно з рекомендаціями робочої групи з оцінки пробіотиків у харчових продуктах ФАО/ВООЗ, пробіотики визначаються як живі мікроорганізми, що, після введення в організм у відповідних кількостях, приносять користь для здоров'я людини [6].

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus — це корисна молочнокисла бактерія, яка є однією з найбільш використовуваних і, отже, споживаних молочних заквасок у всьому світі. Ця гомоферментативна бактерія була першою описаною лактобактерією, яка бере участь у ферментації йогурту та різноманітних інших ферментованих продуктів, включаючи сири. Він має довгу історію безпечного використання, а також задокументовані пробіотичні ефекти lato sensu, включаючи полегшення непереносимості лактози [7].

L. bulgaricus має всі властивості стандартних пробіотичних бактерій. Для пробіотичних штамів вкрай важливо мати можливість колонізувати кишечник і виживати у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту (ШКТ), щоб надати переваги здоров’ю. Однак є сумніви щодо адгезії та виживання *L.bulgaricus* після проходження через кишечник людини. Наприклад, *L. bulgaricus* не є рідною флорою ссавців, крім того, вони не мають достатньої кількості генів гідролази жовчних солей і не можуть синтезувати білки, що зв’язують муцин, що важливі для виживання в ШКТ. Однак регулярне вживання йогурту заквашеного *L. bulgaricus* може сприяти колонізації цих бактерій у кишечнику.

Досліджували відновлення життєздатних *L. bulgaricus* у зразках фекалій 20 здорових добровольців, яких годували комерційним йогуртом протягом 1 тижня, і виявили, що ці бактерії присутні в зразках, що свідчить про те, що бактерії можуть пережити транзит у шлунково-кишковому тракті [8].

Лактіалє – синбіотик (пробіотик + пребіотик), який містить комплекс семи корисних бактерій – біфідобактерій, лактобактерій і стрептококка, які в нормі присутні в мікрофлорі кишечника здорової людини. Кожна капсула містить 7 корисних штамів пробіотичних мікроорганізмів [9]:

Lactobacillus casei
Lactobacillus rhamnosus
Streptococcus thermophilus
Bifidobacterium breve
Lactobacillus acidophilus
Bifidobacterium longum
Lactobacillus bulgaricus

Рекомендації до споживання: комплекс корисної мікрофлори, який містить дієтична добавка «Лактіалє®», підтримує рівновагу імунної та нервової системи, сприяє відновленню балансу мікрофлори кишечнику при його порушенні внаслідок лікування антибіотиками, змін клімату під час подорожей, дії несприятливих факторів навколишнього середовища, стресів, нерегулярного та неякісного харчування, переїдання і зниження імунітету, відсутності доброякісної питної води [10].

Рекомендації до застосування

Комплекс корисної мікрофлори, що міститься в дієтичної добавці «Лактіалє», підтримує рівновагу імунної та нервової системи, сприяє відновленню балансу мікрофлори кишечнику при його порушенні внаслідок лікування антибіотиками, змін клімату під час подорожей, впливу несприятливих факторів навколишнього середовища, стресів, нерегулярного і неякісного харчування, переїдання і зниженні імунітету, відсутності доброякісної питної води [11].

Спосіб застосування

Дорослим і дітям з 12 років: по 2 капсули один раз на день після основного прийому їжі.

Не є лікарським засобом.

Термін споживання

4 тижні, подальше споживання та можливість повторного курсу узгоджувати з лікарем.

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ *LACTOBACILLUS BULGARICUS*

2.1. Обґрунтування вибору Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus та поживного середовища для його культивування

Пробіотики - це препарати, які містять живі мікроорганізми і використовуються як ліки або додаються до їжі як функціональні продукти харчування. Найпоширенішими пробіотичними штамами є молочнокислі бактерії, зокрема бактерії роду *Lactobacillus*. Розглянемо кілька продуцентів *Lactobacillus*, які є основою пробіотичних препаратів.

Lactobacillus — це рід грампозитивних факультативно анаеробних бактерій, також відомих як одна з основних груп пробіотичних організмів, які беруть участь у функціональних продуктах харчування. Загальною рисою цих мікроорганізмів є їх антагоністична активність проти деяких патогенів, таких як *Salmonella spp., Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Clostridium perfringens* і *Helicobacter hepaticus*. Здатність *L. plantarum* і *L. reuteri* до гідролізу фітинової кислоти є цінною в технології переробки хліба.[12]Інокуляція гетероферментативних молочнокислих бактерій до силосу з люцерни спричиняє збільшення виробництва молочної та оцтової кислот, отже, зниження pH, зменшення кількості дріжджів і цвілі та інгібування Enterobacterium *i* Klebsiella *pneumoniae* . Лактобактерії широко застосовуються в промислових процесах виробництва ферментів, наприклад глюкозоутворюючої амілази і лактази. Різні штами *лактобацил* є основними ферментативними продуцентами молочної кислоти та **γ** -аміномасляної кислоти, які використовуються в промислових процесах, а також як закваски в молочних продуктах [12].

У *таблиці* 2.1 наведена порівняльна характеристика продуцентів пробіотичного препарату «Лактіалє®».

Дані для порівняння у табл. 2.1 були проведені серед трьох мікроорганізмів, які входять у мультикомпонентний пробіотичний. Так, згодно проаналізованої літератури було відібрано три мікроорганізми однієї родини (які є складовими «Лактіалє®»), а саме: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* PTCC177 [13], *Lactobacillus rhamnosus* BRM 029693 [14] та *Lactobacillus acidophilus* DGK [15].

Проаналізувавши дані стосовно продуктивності та біосинтезу клітин, можна зробити висновок, що *Lactobacillus delbrueckiisubsp. bulgaricus* PTCC177 є найбільш продуктивним серед представлених продуцентів (концентрація біомаси становить 5,1 г/л). У двох інших продуцентів *Lactobacillus rhamnosus* BRM 029693 та *Lactobacillus acidophilus* DGK цифра продуктивності дещо нижча (2,4 та 4,54 г/л відповідно). При цьому час культивування у всіх продуцентів є однаковим.

Щоб остаточно зробити висновок щодо обраного штаму у *табл. 2.2.* вирахуємо вартість поживного середовища. Відповідно до зроблених розрахунків найдорожчим є середовище для культивування *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* PTCC177 (39,9 грн), але зважаючи на невелику різницю у ціні на 1 літр середовища у порівнянні *L. rhamnosus* BRM 029693 та *L.s acidophilus* DGK (23,9 та 32,3 грн відповідно). Обираємо саме першого продуцента.

Останнім порівнянням буде етап вибору біологічного агенту за умовною вартістю 1г цільового продукту. Дані наведені у *табл. 2.3.*

Таблиця 2.1

Обґрунтування вибору біологічного агента для одержання компонента препарату «Лактіалє®»

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість процесу, год	Особливості технологічного процесу	Література
Lactobacillus delbrueckiisubsp. bulgaricus PTCC177	Молочна депротиїнізована сироватка лактоза – 50 , пептон - 10, дріжджовий екстракт– 10, $C_2H_3NaO_2$ – 5,0, KH_2PO_4 – 2; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.2; $MnSO_4 \times 4H_2O$ – 0,05; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,03	5,1	48	t= 37°C, pH 6 6% HCl та 6% NaOH	Rezvani F., Ardestani F., Najafpour G. Growth kinetic models of five species of *Lactobacilli* and lactose consumption in batch submerged culture. *J.Brazil. Micrrobiol*. 2017. doi: 10.1016/j.bjm.2016.12.007 [13]
Lactobacillus rhamnosus BRM 029693	глюкоза – 10, пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, цитрат амонію – 2, $MgSO_4 \times 7H_2O$ –2	2,4	48	t=37°C, pH 5,6	de Freitas, R. M., Carvalho, J. D. G., Bruno, L. M., & Pinto, G. A. S. Production of Lactobacillus rhamnosus BRM 029693 in feed-batch fermentation. Research, Society and Development, 9(7), 2020. e531974280-e531974280. DOI: https://doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4280 [14]
Lactobacillus acidophilus DGK	глюкоза –10, дріжджовий екстракт – 10, соєвий пептон – 10, цитрат амонію – 2, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2, CH_3COONa – 5, $MnSO_4 \times 4H_2O$ – 0,05, кукурудзянийекстракт – 10 мл/л	4,54	48	t=37°C, pH 6,1	Hwang, C. F., Lin, C. K., Yan, S. Y., Chang, R. H., & Tsen, H. Y. Enhancement of biomass production and nutrition utilization by strain Lactobacillus acidophilus DGK derived from serial subculturing in an aerobic environment. *African Journal of Biotechnology*, *14*(3), 248-256. 2015. DOI: 10.5897/AJB2013.12839 [15]

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг/л	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації
Lactobacillus delbrueckiisubsp. bulgaricus PTCC177	Молочна сироватка – 1л	5	5	13
	Лактоза – 50	62	3,1	1
	пептон 10	1320	13.2	2
	дріжджовий екстракт– 10	1800	18	3
	$C_2H_3NaO_2$ – 5,0	72	0.36	4
	KH_2PO_4 – 2	98	0.196	5
	$MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.2	27	0.0054	6
	$MnSO_4 \times 4H_2O$ – 0,05	39	0.00195	7
	$FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,03	38	0.00114	8
	Вартість 1 л середовища – 39,9 грн			
Lactobacillus rhamnosus BRM 029693	глюкоза – 10	70	0.7	9
	пептон – 10	1320	13,2	2
	дріжджовий екстракт – 5	1800	9	3
	цитрат амонію – 2	450	0,9	10
	$MgSO_4 \times 7H_2O$ –2	27	0.054	6
	Вартість 1 л середовища – 23,9 грн			
Lactobacillus acidophilus DGK	глюкоза –10	70	0.7	9
	дріжджовий екстракт – 10	1800	11	3
	пептон – 10	1320	18	2
	цитрат амонію – 2	450	0,9	10
	$MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2	27	0.0054	6
	CH_3COONa – 5	180	0.9	11
	$MnSO_4 \times 4H_2O$ – 0,05	39	0.00195	7
	Кукурудзяний екстракт – 10 мл/л	78	0.78	1
	Вартість 1 л середовища – 32,3 грн			

Ціни вказані на вересень 2023 року:

1. https://prom.ua/ua/p1068862576-laktoza-pischevaya.html?&primelead=Mi40
2. https://www.systopt.com.ua/item-pepton-fermentatyvnyj
3. https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html
4. https://www.systopt.com.ua/item-natrij-otstovokyslyj-atsetat-natriyu
5. https://prom.ua/ua/p1791718668-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?&primelead=Mi40

6. https://ahc.in.ua/ua/p845202084-sulfat-magniya-semivodnyj.html
7. https://himfarminvest.com.ua/margantsa-sulfat
8. https://flagma.ua/uk/sulfat-zhelezaii-o14568921.html
9. https://prom.ua/ua/p43923205-glyukoza-pischevaya-dekstroza.html
10. https://prom.ua/ua/p1307940651-ammonij-limonnokislyj-zameschennyj.html?&primelead=MS4wNQ
11. https://www.covalent.com.ua/ru/shop/sodium_acetate/
12. https://prom.ua/ua/p1310282824-ekstrakt-kukurudzyanij-litriv.html?&primelead=MC44NQ
13. https://www.olx.ua/d/uk/obyavlenie/syvorotka-molochnaya-IDOCtdN.html

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1г цільового продукту

Біологічний Агент	**Концентрація біомаси г/л**	**Вартість 1 л середовища, грн**	**Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г**	**Тривалість культивування, год**	**Концентрація цільового продукту утвореного за годину, г/год**
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus PTCC177	5,1	39,9	7,8	48	0,1
Lactobacillus rhamnosus BRM 029693	2,4	23,9	9,96	48	0,05
Lactobacillus acidophilus DGK	4,54	32,3	7,11	48	0,09

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus

Із загальної кількості мікроорганізмів в лактобацили виду *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus* за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями 9 (34,7%) штамів були віднесені до лактококів, 13 (50%) штамів - до лактобацил, 4 (15,3%) штаму - до дріжджів [16]. Дані представлені рисунку 2.1.

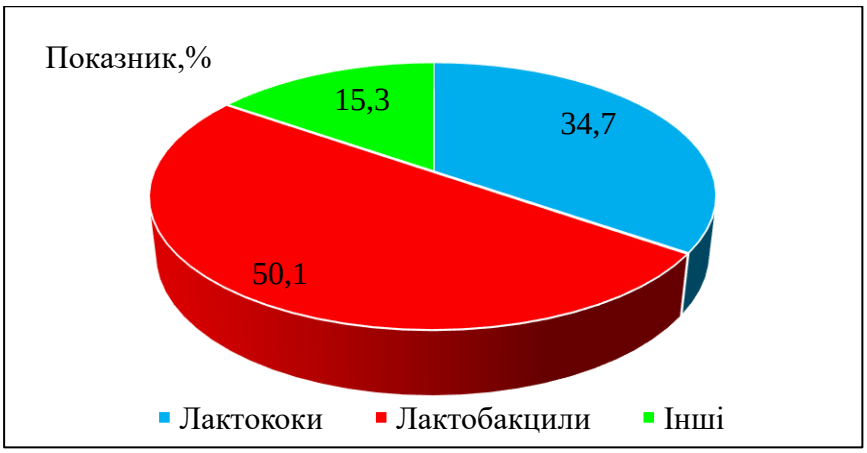

Рис. 2.1. Загальна кількість виділених мікроорганізмів в лактобацили виду Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus

При розвитку в рідкому середовищі та суслі дріжджі утворюють осад. По морфології клітин, нездатності утворювати суперечки та псевдоміцелій і за типом розмноження культури віднесені до роду Torulopsis.

Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus мають широкий спектр біохімічних та фізіологічних властивостей. Незважаючи на це, вони характеризуються метаболізмом бродильного типу, при якому принаймні половина вуглецю у кінцевих продуктах бродіння переходить у лактат. Залежно від продуктів, які утворюються в результаті бродіння, молочнокислі бактерії зазвичай класифікуються на дві групи: гомоферментативні та гетероферментативні [17].

Гомоферментативні види, переважно, утворюють молочну кислоту в результаті бродіння (85% і більше), а також невеликі кількості фумарової та бурштинової кислот, летких кислот, етилового спирту та вуглекислого газу. Вони використовують шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса (гліколіз) для утворення 2 молей лактату з кожного моля глюкози.

Під час цього процесу синтезується 2 молекули АТФ. Оптична активність утвореного лактату відрізняється у різних видів і залежить від стереоспецифічності лактатдегідрогенази (ферменту, який каталізує відновлення пірувату до лактату), а також від наявності лактатрацемази в клітині, яка перетворює D-лактат на L-форму (*Табл. 2.1*).

Таблиця 2.1.

Енантіомери лактату продукту гомоферментативного молочнокислого бродіння у лактобацил

Енантіомер лактату	Види лактобацил
D-лактат	L. delbrueckii subsp. bulgaricus L. delbrueckii subsp. lactis L. delbrueckii L. jensenii
DL-лактат	L. acidophilus L. curvatus L. helveticus

На ферментативному рівні основною відмінністю між гомо- та гетероферментативними видами є наявність у перших гідролітичних ферментів гліколізу, таких як альдолази, тоді як у других присутні фосфокетолази. Внаслідок цього гомоферментативні види не можуть зброджувати пентози. Однак існують винятки з цього правила. Наприклад, у L. brevis було виявлено, що вони можуть зброджувати фруктозу по гомоферментативному шляху завдяки наявності індукованої фруктозної альдолази. Також у *L. acidophilus* була виявлена фосфокетолаза, яка дозволяє їй рости на рибозі [17].

До прийняття філогенетичного підходу, заснованого на послідовності 16S рРНК, який став основним у систематиці лактобацил, спроби побудувати класифікацію цих мікроорганізмів базувалися на типі зброджування цукрів. Також враховувалися морфологія клітин, температурний інтервал зростання (здатність рости при 15°C та 45°C) та харчові потреби. За цими ознаками виділяли три фізіологічні групи:

- облігатно гомоферментативні лактобацили (*Thermobacterium*),
- факультативно гетероферментативні (*Streptobacterium*),
- облігатно гетероферментативні (*Betabacterium*) (Табл. 2.2).

Таблиця 2.2.

Фізіологічні групи *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus*

	Облігатно гомоферментативні	Факультативно гетероферментативні	Облігатно гетероферментативні
Зростання при 45 °C	+	-	±
Зростання при 15 °C	-	+	+
Зброджування рибози	-	+	+
Утворення газу зглюконату	-	+	+
Альдолаза	+	+	-

Якщо взяти до уваги відому варіабельність фізіологічних та біохімічних властивостей *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus*, очевидні проблемні моменти цієї систематики. Проте іноді її використовують і сьогодні.

Крім вуглеводів, *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus* потребують різних чинників для свого розвитку, таких як амінокислоти, вітаміни, нуклеотиди. Рибофлавін, пантотенова кислота та нікотинова кислота є найбільш необхідними для життєдіяльності більшості видів, в той час як тіамін необхідний переважно гетероферментативним видам *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus*. Біотин та вітамін B12 потрібні лише деяким штамам [18].

Потреба у фолієвій кислоті, рибофлавіні, піридоксальфосфаті та пара-амінобензойній кислоті може різнитися у різних видів. Іноді Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus називають "метаболічними інвалідами", оскільки вони втратили здатність до синтезу ряду метаболітів, ймовірно, внаслідок своєї спеціалізації (зростання в молоці та інших середовищах, багатих на поживні та ростові речовини).

Так, вони не можуть синтезувати порфірини, включаючи гем. Проте деякі види лактобацил можуть використовувати порфірини з навколишнього середовища, наприклад, у середовищах з кров'ю. Це дозволяє їм виявляти каталазну та нітритредуктазну активність, а навіть утворювати цитохроми [18].

Фізіологічною особливістю *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus* є їх кислотостійкість. Найбільш сприятливі для їх зростання злегка відкислені середовища з початковим рівнем pH 5.4-6.4, при цьому зростання культури сповільнюється при досягненні рівня pH 3.6-4.0, залежно від виду та штаму. Деякі види, такі як *L. suebicus, L. casei ma L. plantarum*, можуть зростати навіть при pH 2.8. У лужних і нейтральних середовищах зростання *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus* зазвичай сповільнюється.

2.3. Таксономічний статус Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus

Питання номенклатури і таксономії бактерій роду *Lactobacillus* залишаються відкритими і схильними до перегляду. В даний час рід об'єднує понад 100 видів та представляє найбільшу групу в порядку *Lactobacillales*. Деякі види включають два і більше підвидів.

Ще однією відмінною рисою цієї групи мікроорганізмів є їх стійкість до спирту. Вони можуть розвиватися в поживних середовищах при високих концентраціях етилового спирту (18-24% об'ємних одиниць) [19].

Для лактобацил характерне відновлення нітрату лише в умовах, коли кінцевий pH підтримується на рівні 6.0 та/або присутній гем в середовищі. Желатину вони не розщеплюють. Казеїн також не розщеплюють, але більшість штамів утворюють невелику кількість розчинного азоту. Індолу і сірководню вони не утворюють. Вміст гуаніну та цитозину в ДНК становить від 32 до 55 мол. %.

Усередині роду *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus* можна спостерігати бактерії з різною морфологією. Більшість представників роду мають форму прямих паличок з закругленими кінцями, які можуть бути зібрані у ланцюжки різної довжини, або розташовані поодиноко або попарно [19].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1.Потреба у симбіотику Лактіалє

У кишечнику здорової дорослої людини проживає кілька сотень різних видів бактерій, і загальна маса їхніх колоній може досягати 3 кг. Ці мікроорганізми виконують ряд важливих функцій, таких як перетравлення їжі, всмоктування поживних речовин, підтримка нормальної перистальтики, забезпечення оптимального балансу іонів, формування здорового складу газових середовищ, нейтралізація отрут і підтримка імунітету. Крім того, біфідобактерії впливають на обмін вуглеводів, білків, жирів та інших важливих компонентів [20].

Дисбактеріоз - це стан дисбалансу мікроорганізмів всередині тіла або навколо нього. Відновлення цього балансу може повернути мікрофлору кишечника в норму. Дисбактеріоз може бути різних ступенів тяжкості: латентний, середній, важкий. Крім того, виділяють такі типи дисбактеріозу: асоційований, ешерихіозний, грибковий, стафілококовий, протеїновий [21].

Важливо мати знання про те, як лікувати дисбактеріоз кишечника за допомогою функціональної дієти. Оскільки для правильного розвитку корисної мікрофлори потрібні пектин та клітковина, в раціоні варто включити зернові культури, овочі, фруктові плоди та водорості. Крім того, організму потрібні амінокислоти, такі як глутамін і аргінін, які можна отримати з соєвого молока.

Лікування дисбактеріозу за допомогою пребіотиків має на меті постачання організму речовин, які не засвоюються, але сприяють розвитку корисної мікрофлори. До таких речовин (пребіотиків) відносяться ізомери фруктози, галактоза та олігосахариди. Чим багатше пребіотиків в раціоні, тим краще. Ці речовини містяться в зернових та молочних продуктах, особливо в цикорі, кукурудзі, часнику, пшениці та цибулі [21].

Порушення балансу корисних мікроорганізмів у кишечнику часто супроводжується активізацією патогенних мікроорганізмів. Дисбактеріоз призводить до порушення всмоктування поживних речовин та функціонування травної системи. Внаслідок цього в шлунку можуть накопичуватися неперетравлені харчові залишки, що може викликати здуття, бурчання, діарею та інші неприємні симптоми [20].

Нерегулярне харчування, стрес, неправильний розпорядок дня, малорухливий спосіб життя та інші фактори можуть негативно впливати на процес травлення. Це може призводити до появи таких симптомів, як бурчання, здуття або спазми в животі, а також проблем з випорожненням. Наявність цих проявів може створювати значний дискомфорт у повсякденному житті людини, але також може мати серйозніші наслідки для здоров'я кишківника [22].

Провокувати порушення балансу мікроорганізмів можуть різні фактори, проте впливу більшості з них можна запобігти [23].

Основні фактори, які сприяють виникненню дисбактеріозу:

- прийом антибактеріальних препаратів для лікування деяких станів і захворювань — дисбактеріоз після антибіотиків досить поширене явище;
- зміна місця проживання і раціону харчування;
- проживання в забрудненій місцевості;
- вживання в їжу немитих овочів і фруктів, а також інших продуктів;
- різні захворювання шлунково-кишкового тракту;
- частий прийом спиртних напоїв і продуктів, що містять велику кількість цукру і харчових добавок;
- часті стреси та нервові переживання — вони здатні послаблювати імунітет;
- недостатня особиста гігієна.

Рекомендації до споживання: комплекс корисної мікрофлори, який містить дієтична добавка «Лактіалє®», підтримує рівновагу імунної та нервової

системи, сприяє відновленню балансу мікрофлори кишечнику при його порушенні внаслідок [24]:

- лікування антибіотиками;
- змін клімату під час подорожей;
- дії несприятливих факторів навколишнього середовища;
- стресів;
- нерегулярного та неякісного харчування;
- переїдання і зниження імунітету;
- відсутності доброякісної питної води.

Враховуючи всі вищеописані фактори, які призводять до порушень балансу кишкової мікрофлори, а також стан постійного стресу у якому перебувають українці, все це призводить до негативних проявів у роботі кишківника. Періодичне приймання таких препаратів нормалізує його роботу.

3.2.Розрахунок потужності виробництва

За прогнозами експертів Всесвітньої організації охорони здоров'я, у XXI столітті хвороби органів травлення (ХОТ) будуть посідати одне з провідних місць у структурі захворюваності населення поряд із серцево-судинною патологією. Факторами ризику виникнення цих захворювань є низька якість харчування, його незбалансованість, неадекватна організація харчування вдома і на роботі, психоемоційне перенапруження, самолікування та пізнє звернення за кваліфікованою медичною допомогою [25].

Хвороби органів травлення впливають на всі вікові групи населення. Більшість пацієнтів з цими захворюваннями належать до працездатного віку. Варто зазначити, що поширеність шлунково-кишкових захворювань (ШКЗ) вдвічі менша серед дорослих, ніж серед дітей, та вдвічі більша серед міського населення порівняно з сільським [25].

Пробіотики широко представлені на українському фармацевтичному ринку. У більшості випадків це продукти, що містять біфідобактерії, кишкову паличку, лактобактерії та дріжджі. Сотні пробіотичних продуктів харчування та харчових добавок наразі доступні широкому колу споживачів, і кількість зареєстрованих

пробіотичних продуктів в Україні постійно зростає. Наразі на українському фармацевтичному ринку переважають імпортні пробіотики. Детальний перелік присутніх пробіотиків в Україні наведено у *таблиці 3.1.*

Таблиця 3.1

Перелік присутніх пробіотиків в Україні

Монокомпонентні препарати	Лактобактерин (суха речовина), Україна
	Біфідумбактерин (суха речовина), Україна
	Біо-Гая (каплі), Швейцарія
	Колібактерин (суха речовина), Україна
	А-Бактерин (суха речовина), Україна
Полікомпонентні	Біфіформ-бебі (каплі), Данія
	Лінекс (капсули), Словенія
	Біфіформ (капсули), Данія
	Біфікол (флакони), Україна
	Лактіалє (капсули), Україна
Комбіновані (симбіотики)	Лактовіт форте (капсули), Великобританія
	Лацидофіл (капсули), Україна
	Біфіформ дитячий (порошок), Данія
	Лактив-ратіофарм (капсули, порошок, флакони), Італія
	Біфіформ комплекс (таблетки), Данія
Рекомбінантні	Субалін (суха речовина), Україна
	Хілак, хілак-форте (каплі), Німеччина
Самоелімінуючі	Бактисубтіл (капсули), Югославія
	Ентерожерміна (питні ампули), Франція
	Біоспорин (суха речовина), Україна
	Ентерол (суха речовина), Франція

За офіційними даними, стан здоров’я населення України у 2017 році характеризувався значно питомою вагою ХОТ у структурі захворюваності та поширеності хвороб серед всіх вікових груп населення України. Так, Абсолютний показник захворюваності у 2017 р. становив ***7 097 303,0 чол***. [25].

<u>Спосіб споживання та рекомендована добова доза</u>:

Дорослим і дітям з 12 років: по 2 капсули один раз на день після основного прийому їжі.

Термін споживання: 4 тижні, подальше споживання та можливість повторного курсу узгоджувати з лікарем.

Одна упаковка (30 капсул) = 15 днів лікування

Тоді, курс становить (4 тижні) - 30 днів лікування

Одна капсула містить 230мг пробіотичних культур

****Беручи до уваги, що кількість супровідних речовин в одній капсулі нам невідома (це є частиною комерційної технології виробника) припускаємо, що відсоток супровідних компонентів становить 30%.***

Тоді сумарна маса допоміжних речовин у капсулі буде:

230мг – 100%

X мл – 30%

$$X = \frac{230 \times 30}{100} = 69$$ ***мг сумарна маса допоміжних речовин у капсулі.***

Тоді сумарна маса клітин у капсулі становить:

230мг – 69мг = 161мг сумарна маса клітин дієтичної добавки в одній капсулі.

Оскільки, наше виробництво зосереджено на культивування одного з семи компонентів біологічної добавки «Лактіалє», а саме *Lactobacillus bulgaricus,* а співвідношення мікроорганізмів у даному препараті відсутнє, то припустимо що ці компоненти знаходяться в рівній пропорції:

Тому, 161 мг/7 ≈ 23 мг/46мг (містить одна капсула *Lactobacillus bulgaricus*/ дві капсули на добу)

Тоді, кількість клітин, яка необхідна для лікування однієї людини на місяць становить:

46мг × 30днів = 1380 мг – кількість клітин *Lactobacillus bulgaricus* необхідна для збагачення добавки «Лактіалє» на 4 тижні.

Тепер розрахуємо потребу у даному компоненті для забезпечення населення для лікування даною добавкою:

1380 мг × ***7 097 303*** чол. = 9794278140 мг ≈ 9794 кг

Так, для початку розрахуємо долю ринку, з тих основних пробіотичних препаратів які представлені на ринку України (*табл. 1.1 - 21 аналоги пробіотичних препаратів*). Тоді загальна доля ринку становитиме (*загальна потреба/кількість аналогів*):

9794 кг/ 21 ≈ 466 кг припадає на наш препарат

Беручи до уваги різних виробників у випуску аналогічної продукції, пропонуємо почати виробництво *з невеликого пілотного підприємства*, та забезпечити невелику потребу у даних клітинах, а саме 20% від потреби:

466 кг × 20% ≈ 93 кг

Для одержання такої кількості клітин об'єм культуральної рідини має становити:

0,0051 кг – 1л

93 кг – Хл

$$X = \frac{93\ кг\ \times 1л}{0{,}0051\ кг} \approx 18235\ л \approx 18\ м^3/рік$$

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (Еф), які становлять від 10 - 15%. Отже, з урахуванням покриття 10% втрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом має становити:

$$Vкр. = \frac{18235 \times 10}{100} \approx 1824\ л\ (10\%\ втрат) + 18235\ л = 20059\ л\ \approx 20\ м^3$$

Тобто, для накопичення 93 кг клітин необхідно 20 $м^3$ культуральної рідини.

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

Зважаючи на те, що отримуватимемо ми пробіотичну культуру, а річний об`єм культуральної рідини дорівнює 20 $м^3$/рік – доцільним є здійснення культивування упродовж 330 календарних днів. Весь інший час виробництво

може бути переорієнтоване на випуск іншої продукції. Згідно статті, продуцент досягає найбільшої концентрації клітину 5,1г/л [26].

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($Т_{рд}$) 330, тоді кількість культуральної рідини (КР) за цикл становитиме:

$$V_д = V_{гп}/ Т_{рд} = 20059/330 \approx 61 л/доба$$

Кількість КР за цикл буде становити:

$$V_{кр} = (К_1 \times V_д \times Т_{цф})/24 = (1{,}1 \times 61 \times 60)/24 \approx 168 л/цикл$$

де, $Т_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (48 год) та час підготовки ферментера до роботи (12 год).

Тоді таку кількість культуральної рідини можна отримати у ферментері геометричний об'єм якого має становити:

$$V_г = V_{цк}/ К_з = 168/0{,}7 \approx 240 л$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

Кзф = Vцк/Vф =168 /240=0,67 , що не перевищує заданого значення.

3.4.Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують Vкр = 168 л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

Vроб.1 = Vкр/(1-Еф) =168/(1-0,15) ≈ 198л,

де Еф – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом

Vроб.1=198л.

При вибраному коефіцієнті заповнення Кзап = 0,7-0,8 розраховують можливий геометричний об'єм ферментера (Vф), що становить

Vф = Vроб.1г/Кзап = 198/0,7 = 283л.

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер **Vсф = 250** л, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

Кз1= Vроб.1/Vсф = 198/250 =0,79.

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

Vпс1 = Vроб.1/(1+Хф) = 198/(1+0,1) ≈ 180 л , де Хф = 0,1 – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить

Vпм1 = Vроб.1 – Vпс1 = 198-180=18л.

Для одержання 18 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

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

Vроб.2 = Vпм1/(1-Епа) = 18/(1-0,10) ≈ 20 л.

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

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити

Vпс2 = Vроб.2/(1+Хпа) = 20/(1+0,1) ≈ 18л,

де Хпа = 0,1 – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

Vпм2 = Vроб.2 – Vпс2 = 20-18 = 2л.

Кількість інокуляту **Vроб.2=20л** можна одержати під час культивування у посівному апараті:

Vпа2=Vроб.2/Кзап=20/0,7≈28л.

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер **Vсф ≈ 30л**, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

Кз2=Vроб.2/ Vсф = 20/30 = 0,7.

Кількість інокуляту для засіву інокулятора Vпм2 = 2 л можна одержати

культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об’ємом Vколб = 750 мл та коефіцієнтом заповнення Кзк=0,4. Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитеме **Nколб** = Vпм3/(Vколб · Кзк) = 2000/750·0,4 ≈ 5. Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 5 качалочних колб. Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу буде відбуватись у ферментері об’ємом 250 л з коефіцієнтом заповнення 0,79 буде проходити у два етапи (у колбах на качалці та в інокуляторі 30 л).

Таблиця 3.2

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

Об’єм ферментера, л	**Коефіцієнт Заповнення**	**Робочий об’єм ферментера, л**	**Об’єм посівного матеріалу (10%), л**	**Конденсат (10%), л**	**Об’єм підготовки поживного середовища, л**
250	0,7	198	18	18	180
30	0,7	20	2	1,8	18
7 колб на 750 мл	0,4	-	-	-	2

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ *LACTOBACILLUS BULGARICUS*

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus

Ростовим субстратом для отримання біомаси за допомогою *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* є лактоза[27]. Згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes катаболізм лактози у *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* відбувається шляхом розкладання ростового субстрату на глюкозу та галактозу під дією ферменту бета-галактозидази (КФ 3.2.1.23) , потім відбувається залучення глюкози до гліколізу та перетворення галактози на глюкозо-6-фосфат за допомогою УДФ-вуглеводів [28].

Глюкоза за участю глюкокінази (КФ 2.7.1.2) перетворюється на глюкозу 6-фосфат, де остання за дії глюкозо-6-фосфат ізомерази (КФ 5.3.1.9) перетворюється на фруктозо- 6-фосфат. Фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11) активує перетворення фруктозо-6-фосфату у фруктозо-1,6-дифосфат. Ферментативна дія фруктозодифосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) на фруктозо-1,6-дифосфат зумовлює перетворення її на гліцеральдегід 3-фосфат та діоксіацетонфосфат, який під дією тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід 3-фосфат . До подальшого катаболізму глюкози залучається гліцеральдегід 3-фосфат , під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) він перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у 3-фосфогліцерат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на 3-фосфогліцерат індукує його перетворення на 2-фосфогліцерат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) 2-фосфогліцерат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40) [29].

Галактоза, яка утворюється під час розкладу ростового субстрату, за допомогою ферменту. Галактокіназа (КФ 2.7.1.6) перетворюється на галактозо-1-фосфат. Далі відбувається перетворення на УДФ-галактозу під дією ферменту галактозо-1-фосфат уридилілтрансферази (КФ 2.7.7.12). Ферментна дія УТФ-глюкозо-1-фосфат-уридилілтрансферази (КФ 2.7.7.9) активує перетворення УДФ-галактози на УДФ-глюкозу. Далі УДФ- глюказова перетворюється на глюкозо-6-фосфат і залучається до гліколізу [28].

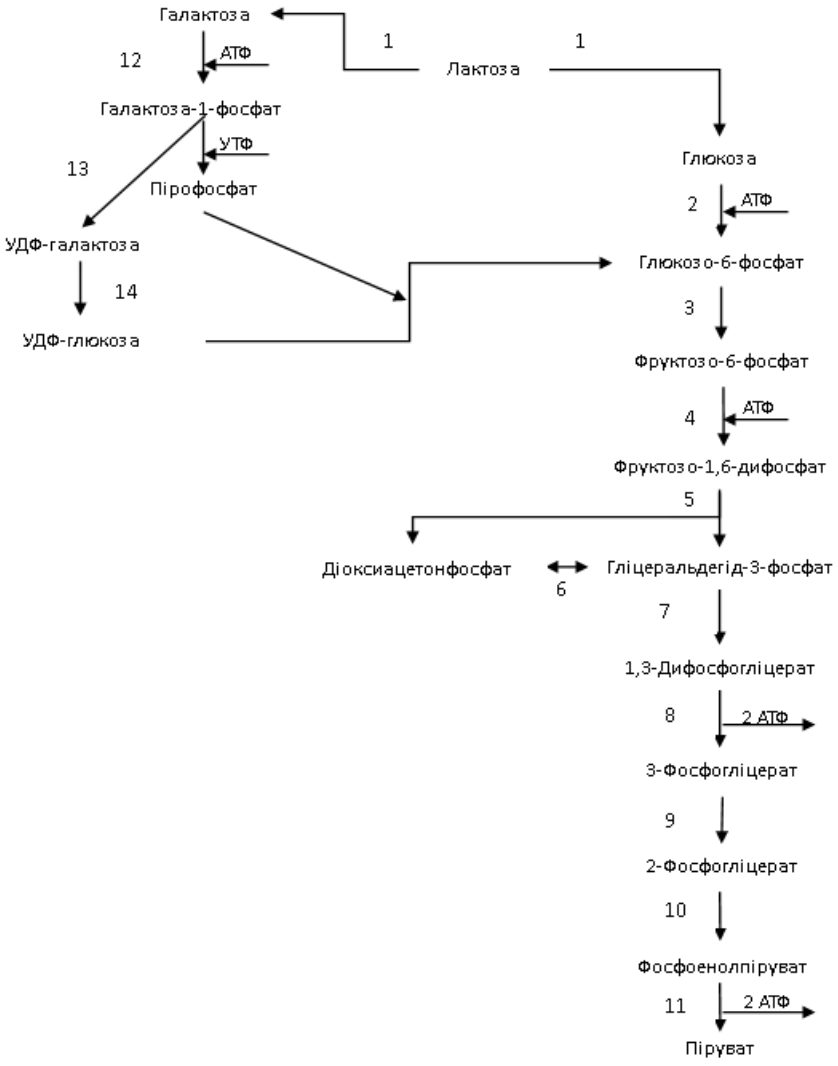

Рис. 4.1 Схема катаболізму ростового субстрату у *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* [28, 29].

Ферменти: 1– бета-галактозидаза (КФ 3.2.1.23); 2– гексокіназа (КФ 2.7.1.1); 3– глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9); 4– 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 5– фруктозодисфосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13); 6– тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1); 7– гліцеральдегід-3-

фосфатдегідрогеназа (КФ 4.2.1.11); 8– фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 9 - 2,3-дифосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 10 – Енолаза (КФ 4.2.1.11), 11 - Піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 12– галактокіназа (КФ 2.7.1.6); 13– Гал-1-фосфат уридилілтрансфераза (КФ 2.7.7.12); 14– УТФ-глюкозо-1-фосфат-уридилілтрансфераза (КФ 2.7.7.9);

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus

Для формування біомаси клітина має синтезувати основні органічні сполуки, які входять до її складу, а саме: ліпіди, нуклеїнові кислоти, білки та полісахариди, які є компонентами клітинної стінки [30].

При рості на вуглеводах анаплеротичними реакціями, які будь поповнювати втрати інтермедіатів ЦТК є оксинення пірувату та фосфоенолпірувату до оксалоацетату [31].

Глюкозо-6-фосфат залучається до пентозофосфатного циклу, де утворюється попередник біосинтезу пуринових нуклеотидів рибозо-5-фосфат та еритрозо-4-фосфат, який є попередником синтезу аміноксимлот [31].

Ліпіди прокаріотів (Фосфо- та гліколіпіди) відрізняються за будовою та шляхом біосинтезу від ліпідів еукаріотів (тригліцеріди). Синтез ліпідів прокаріот починається з утворення 3-фосфогліцерину з діоксиацетонфосфату під дією гліцерол-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.5.3). Далі відбувається утворення ацил-3-фосфоглфцерину за допомогою гліцерол-3-фосфатацилтрансферази (КФ 2.3.1.275). Останнім спільним етапом для синтезу ліпідів прокаріот є утворення діацил-3-фосфогліцерину, ця реакція активується 1-ацил-sn-гліцерол-3-фосфат-ацилтрансферазою (КФ 2.3.1.51). Гліколіпіди утворються з діацил-3-фосфогліцерину та УДФ-глюкози, а утворенню фосфоліпід передує утворення ЦДФ-Діацилгліцерину за допомогою фосфатидатцитидилтрансферази (КФ 2.7.7.41), а далі з ЦДФ-Діацилгліцерину утворюються фосфоліпіди [31, 32].

Попередником синтезу білків є 20 амінокислот, які погруповані на 4 родини. Синтез піруватної родини (аланін, валін, лейцин) відбувається через піруват, який є попередником біосинтезу цієї родини. Деякі амінокислоти, які також

належать до піруватної родини, а саме серин, гліцин та цистеїн, мають фосфогліцерат в якості попередника біосинтезу [33].

2-Оксоглутарат є попередником глутаматної родини (глутамат, глутамін, пролін, аргінін, а також лізин, який у дріжджів синтезується через аміноадипінову кислоту) [33].

Попередником синтезу аспартатної родини (аспартат, аспарагін, метіонін, треонін та ізолейцин) є оксалоацетат, який є інтермедіатом ЦТК [33].

Попередником ароматичної амінокислоти гістидину є фосфорибозилпірофосфат, також ця сполука використовується для синтезу триптофану. Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват є попередниками фенілаланіну, тирозину і триптофану [33].

Синтез пуринових нуклеотидів починається з перетворення рибозо-5-фосфату на 5-фосфорибозил-1-пірофосфат за допомогою рибозо-фосфат-пірофосфокінази (КФ 2.7.6.1), який далі перетворюється на імідазольний нуклеотид. Цей нуклеотид перетворюється на інозинмонофосфат. Через декілька реакцій інозинмонофосфат перетворюється на гуанозинмонофосфат Далі відбувається перетворення гуанозинмонофосфату на гуанозинтрифосфат: перетворення на гуанозиндифосфат за допомогою ферменту гуанілаткіназb (КФ 2.7.4.8), а потім перетворення на гуанозинтрифосфат за допомогою ферменту нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6) [34].

Синтез піримідинових нуклеотидів починається з конденсації карбамоїлфосфату та аспартату за дією ферменту аспартаткарбамоїлтрансферази (КФ 2.1.3.2) з утворенням карбомоїласпартату. Далі карбамоїласпартат перетворюється на оротат за допомогою ферменту дигідрооротази (КФ 3.5.2.3) та дигідрооротатдегідрогенази (КФ 1.3.5.2). За допомогою оротатфосфорибозилтрансферази (КФ 2.4.2.10) з оротату та 5-фосфорибозил-1-пірофосфату утворюється оротидинмонофосфат. Ця сполука перетворється на уридинмонофосфат, який далі перетворюється на уридиндифосфат, а потім – на уридинтрифосфат під дією уридинмонофосфатсинтетази (КФ 4.1.1.23), УМФ-ЦМФ кінази (КФ 2.7.4.14) та нуклеозиддифосфаткінази (КФ 2.7.4.6). На

останньом етапі утворюється цитидинтрифосфат за допомогою ЦТФ-синтази (КФ 6.3.4.2) [35].

Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus є грам позитивною бактерією, тому в складі клітинної стінки має пептидоглікан. Попередником пептидоглікану є фруктозо-6-фосфат, який за допомогою ферментів глутамін-фруктозо-6-фосфат трансамінази (КФ 2.6.1.16), фосфоглюкозамінмутази (КФ 5.4.2.10), глюкозамін-1-фосфат N-ацетилтрансферази (КФ 2.3.1.157), УДФ-N-ацетилглюкозамін пірофосфорилази (КФ 2.7.7.23) перетворюється на пептидоглікан.

Повна схема біотрансформації ростового субстрату у цільовий продукт наведена на *рис 4.2.*

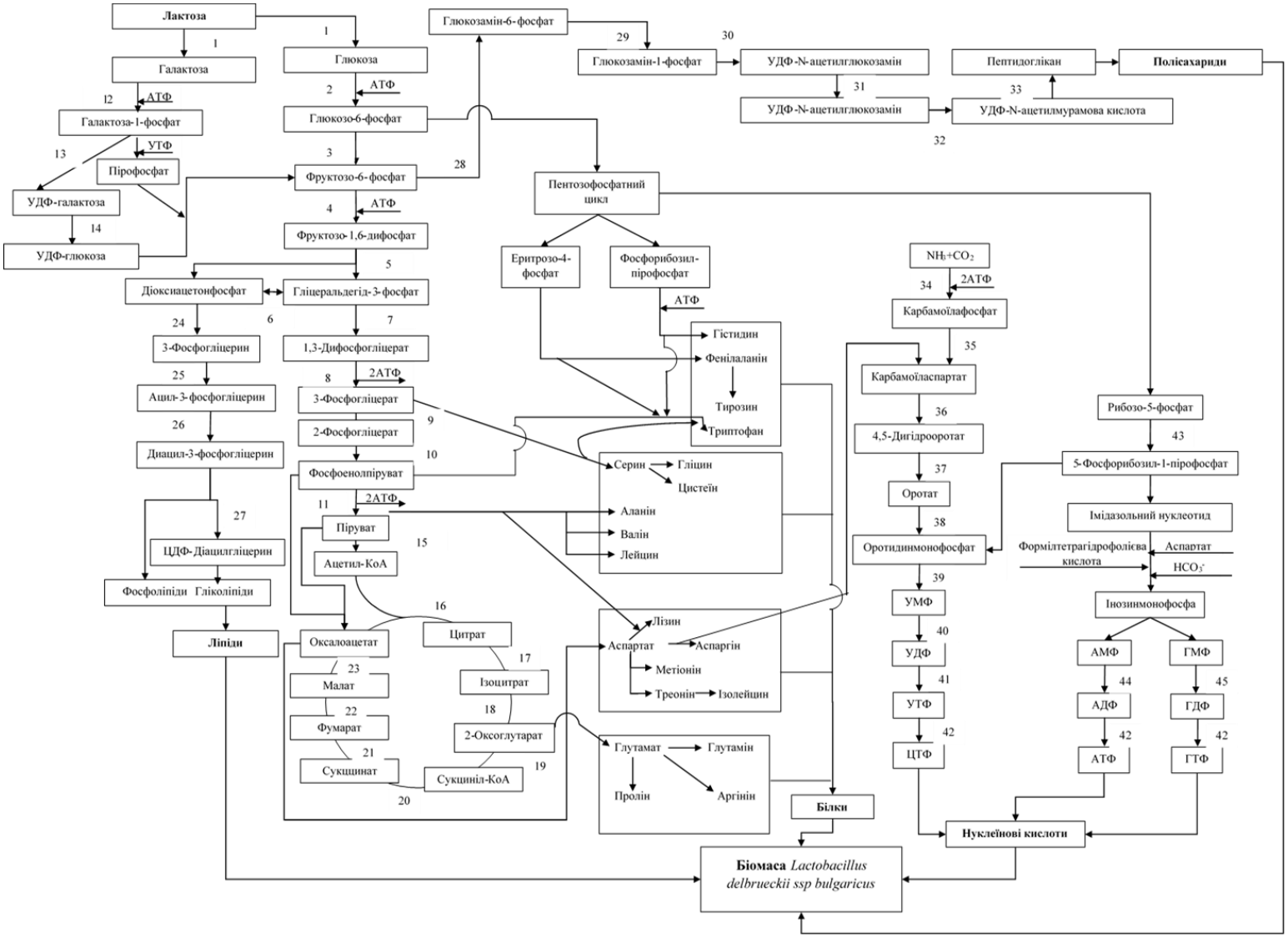

Рис. 4.2. Схема біотрансформації ростового субстрату

Ферменти: 1– бета-галактозидаза (КФ 3.2.1.23); 2– гексокіназа (КФ 2.7.1.1); 3– глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9); 4– 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 5– фруктозодисфосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13); 6– тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1); 7– гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 4.2.1.11); 8– фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 9 - 2,3-дифосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 10 – Енолаза (КФ 4.2.1.11), 11 - Піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 12– галактокіназа (КФ 2.7.1.6); 13– Гал-1-фосфат уридилілтрансфераза (КФ 2.7.7.12); 14– УТФ-глюкозо-1-фосфат-уридилілтрансфераза (КФ 2.7.7.9); 15 – Піруватдегідрогеназа (КФ 1.2.4.1), 16 - Цитратсинтетаза (КФ 2.3.3.1), 17 - Аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3), 18– Ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42), 19 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа (КФ 1.2.4.2), 20 - Сукцинаттіокіназа (КФ 6.2.1.5), 21 – Сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1), 22 – Фумаратгідратаза (КФ 4.2.1.2); 23 - Малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 24 – гліцерол-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.1.5.3); 25 – гліцерол-3-фосфатацилтрансферази (КФ 2.3.1.275); 26 – 1-ацил-sn-гліцерол-3-фосфат-ацилтрансферазою (КФ 2.3.1.51); 27 – фосфатидатцитидилтрансферази (КФ 2.7.7.41); 28 – трансаміназа (КФ 2.6.1.16); 29 – фосфоглюкозамінмутаза (КФ 5.4.2.10); 30 – глюкозамін-1-фосфат N-ацетилтрансферазаа (КФ 2.3.1.157); 31 – УДФ-N-ацетилглюкозамінпірофосфорилаза (КФ 2.7.7.23); 34 – Карбамоїлфосфатсинтетаза (КФ 6.3.4.16); 35 – аспартаткарбамоїлтрансфераза (КФ 2.1.3.2); 36 – дигідрооротаза (КФ 3.5.2.3); 37 – дигідрооротатдегідрогенази (КФ 1.3.5.2); 38 – оротатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.10); 39 – уридинмонофосфатсинтетаза (КФ 4.1.1.23); 40 – УМФ-ЦМФ кіназа (КФ 2.7.4.14); 41 – нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 42 – ЦТФ-синтаза (КФ 6.3.4.2); 43 – аденілаткіназа (КФ 2.7.4.3); 44 – гуанілаткіназа (КФ 2.7.4.8); 45 – рибозо-фосфат-пірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1)

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Вибір умов і способу культивування

Вибір ферментатора для вирощування культури *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* PTCC177 вимагає визначення умов процесу, які безпосередньо залежать від фізіологічних і біохімічних особливостей продуцента.

Штам має наступні культурально-морфологічні особливості: вирощений при 40±1°С протягом 18-24 годин на живильному середовищі MRS, утворює однорідну каламуть та слабкий дрібнодисперсний осад; у напіврідких середовищах утворюються висячі каплеподібні колонії, у товщі агару - білясті дисковидні колонії з нерівними краями до 1 мм у діаметрі; на твердому агаризованому середовищі спостерігаються напівпрозорі білуваті, гладкі блискучі, слабко опуклі, круглі колонії з нерівними краями, діаметром 1-3 мм. Морфологія клітин: грам-позитивні, середньої довжини і товщини з округлими краями, рівні палички розміром від 0,5 до 3-8 мкм, можливе розташування ланцюжками різної довжини від 2 до 6-8 клітин палисавидно. Фізіологічна характеристика штаму: факультативний анаероб, нерухомий, каталазонегативний, не відновлює нітрати в нітрити, не розріджує желатину, слабко гідролізує ескулін, не утворює аміак з аргініну. Молоко закислює, утворюючи кислоту (1,27%), молоко з лакмусом відновлюється без утворення газу, інтенсивно відновлює молоко з метиленовою синню, не росте на середовищах з підвищеним (>4%) вмістом хлористого натрію та pH=9,6; не виживає після прогрівання при температурі 63°С протягом 30 хвилин, не утворює слизу, росте на середовищах з жовчю, слабко гідролізує крохмаль. Не зброджує: арабінозу, мальтозу, дульцит, ксилозу, рафінозу, інозит, рибозу, адоніт, маніт, інулін, целобіозу, галактозу, ескулін, сорбозу, сорбіт, рамнозу, амигдалін, трегалозу, маннозу, L-метил-d-глюкозид, гліцерин.

Штам віднесений до групи *delbruecki* роду *Lactobacillus*, ріст можливий від 28° до 50°С, оптимальна температура від 36 до 40°С. Помітний ріст можливий у діапазоні pH від 3,5 до 8,5, оптимальне значення pH для росту - 6,0±0,4 [36].

Для накопичення біомаси культур було обрано методи глибокого циклу культивування. Безперервне культивування є недоцільним через активний поділ клітин, що відбувається під час експоненціальної фази росту.

Тому культивування бактерій *Lactobacillus delbrueckiisubsp. Bulgaricus* PTCC177 здійснюється при температурі 37 °С та pH 6 методом глибинного культивування, без подачі вільного кисню (оскільки продуцент є факультативним анаеробом) під час виробничого процесу.

5.2.Вибір типу ферментера

Для культивування *Lactobacillus delbrueckiisubsp. bulgaricus* PTCC177 обрано ферментер з мішалкою як основний конструктивний елемент для періодичного перемішування середовища. Це рішення зумовлене фізіолого-біохімічними особливостями штаму та його вимогами до умов культивування.

Для підтримання та регулювання постійної температури в системі ферментатор повинен бути обладнаний сорочкою та датчиками для контролю температури. Сорочка має мати тепловий захист для запобігання виходу тепла за межі ферментатора.

Оскільки *Lactobacillus delbrueckiisubsp. bulgaricus* PTCC177 росте при pH 6, але при виділенні молочної кислоти система підкислюється, щоб цього уникнути, використовується автоматична система стабілізації pH. Регулювання pH здійснюється за допомогою pH-метра, що дозволяє підтримувати оптимальне середовище для росту та розвитку штаму.

Для періодичного перемішування використовується низькошвидкісна лопатева мішалка (рис. 3.1), що допомагає створити круговий потік рідини і забезпечити оптимальні умови для культивування мікроорганізмів. Найпростішими і найефективнішими є мішалки з прямими лопатями, розташованими в радіальному напрямку. Плоскі лопаті також можуть бути

нахилені під фіксованим кутом до обертової поверхні мішалки, що дозволяє зменшити споживання енергії і виділяє цей тип мішалок серед інших [37].

Рис.5.1. Лопатева мішалка

5.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого біосинтезу використовують середовище такого складу, г/л [38]:

- Молочна депротиїнізована сироватка
- лактоза – 50 ,
- пептон - 10,
- дріжджовий екстракт– 10,
- $C_2H_3NaO_2$ – 5,0,
- KH_2PO_4 – 2;
- $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.2;
- $MnSO_4 \times 4H_2O$ – 0,05;
- $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,03.

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об’ємом 250 л з коефіцієнтом заповнення 0,7. Підготовка посівного матеріалу здійснюється у 2 етапи (у колбах на качалках та інокуляторі 30л).

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

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм невеликий (2 л). Проаналізувавши склад поживного середовища, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: молочна депротиїнізована сироватка (режим стерилізації: 121 °С, 15 хв);

Композиція Б: лактоза, дріжджовий екстракт, пептон (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв);

Композиція В: KH_2PO_4, (режим стерилізації: 131°С, 40 хв).

Композиція Г: $C_2H_3NaO_2$, $MgSO_4 \times 7H_2O$ (режим стерилізації: 131°С, 40 хв).

Оскільки, за методичними рекомендаціями розчин мікроелементів готується при умові, що маса компонента менша 10 мг, то у даному випадку потреба у даному розчині відсутня.

За рахунок невеликих об'ємів композиції, приймаємо рішення про окрему стерилізацію солей KH_2PO_4, *та* $MgSO_4$ для унеможливлення випаду осаду.

Розрахунок кількостей компонентів для приготування середовища об'ємом 2 л для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках (*табл.5.1.).*

Таблиця 5.1.

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування в посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	**Концентрація, мл/л, г/л**	**Вміст компонента в 2 л середовища, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, л**
Молочна сироватка	1550	1,55	**А**	1,55
Лактоза	50	100	**Б**	0,4
Дріжджовий екстракт	10	20		
Пентон	10	20		
Вода		**0,4**		
KH_2PO_4	2	4	**В**	0,02
Вода		**0,02**		

$C_2H_3NaO_2$	5	10	**Г**	0,03
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,2	0,4		
$MnSO_4 \times 4H_2O$	0,05	0,1		
$FeSO_4 \times 7H_2O$	0,03	0,06		
Вода		**0,03**		
Разом:		**2**		**2**

5.3.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 30 л

Для цієї стадії необхідно 20 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні *пункту 2.4.1.* Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в (*табл.2.2*). Стерилізація композиції В буде відбуватись безпосередньо в інокуляторі, композиція Б у бутлі в автоклаві, композиція А стерилізуємо у реакторі – змішувачі.

Для того щоб здійснити засів поживного середовища в інокулятор необхідно внести 2 л посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції буде становити 18 л.

Таблиця 5.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 20 л середовища

Компонент поживного середовища	**Концентрація, мл/л, г/л**	**Вміст компонента в 20 л середовища, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, л**
Молочна сироватка	9000	9	**А**	10
Конденсат		**1**		
Лактоза	50	1000	**Б**	3
Дріжджовий екстракт	10	200		
Пентон	10	200		
Вода		**3**		
KH_2PO_4	2	40	**В**	5
$C_2H_3NaO_2$	5	100		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,2	4		
$MnSO_4 \times 4H_2O$	0,05	1		
$FeSO_4 \times 7H_2O$	0,03	0,6		
Вода		**4,5**		
Конденсат		**0,5**		
Разом:		**18**		**18**

5.3.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування у ферменері об'ємом 250 л

Для цієї стадії необхідно 198 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні *пункту 5.3.1.* Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в (*табл.5.3*). Стерилізація композиції В буде відбуватись безпосередньо у виробничому ферментері, композиція А та Б у реакторах – змішувачах,

Для того щоб здійснити засів поживного середовища у ферментер необхідно внести 18 л посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції буде становити 180 л.

Таблиця 5.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 198 л середовища

Компонент поживного середовища	**Концентрація, мл/л, г/л**	**Вміст компонента в 198 л середовища, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, л**
Молочна сироватка	90000	90	**А**	100
Конденсат		**10**		
Лактоза	50	9900	**Б**	30
Дріжджовий екстракт	10	1980		
Пентон	10	1980		
Вода		**27**		
Конденсат		**3**		
KH_2PO_4	2	396	**В**	50
$C_2H_3NaO_2$	5	990		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,2	39,6		
$MnSO_4 \times 4H_2O$	0,05	9,9		
$FeSO_4 \times 7H_2O$	0,03	5,94		
Вода		**45**		
Конденсат		**5**		
Разом:		**180**		**180**

Обгрунтування вибору розчинів для регуляції pH

Так як бактерії роду *Lactobacillus* утворюють молочну кислоту, що призводить до зміни pH, яке не бажане, так як для кращого накопичення біомаси необхідно забезпечити оптимальний для продуцента рівень pH 6. Тому, має необхідність закупівля готового титруючого 25% розчину NH_4OH для виробничого ферментера (250л), а також для культивування в інокуляторі (30л). Готовий розчин зберігається на складі в заводських каністрах. Також готуємо титруючі розчини для спільної стерилізації солей, а саме 6%розчин HCl для підкислення середовища та стерильний 6% розчин NaOH для стабілізації pH. Далі готові розчини, з дотриманням правил асептики завантажуються до системи pH –метрії виробничого устаткування.

Обґрунтування вибору піногасника

Проаналізувавши склад поживного середовища (*склад наведений у пункті 5.3*), можна зробити висновок, що можливе мінімальне піноутворення. У даному складі поживного середовища присутня невелика концентрація пептону, що і можуть утворити невелику піну у процесі біосинтезу, але в той же час в нас не буде активної аерації середовища для культивування, що і мінімізує утворення піни. Оскільки більшість виробничого устаткування з заводу вже обладнано механічним піногасником, то окреме приготування піногасника є недоречним.

5.4. Підготовка персоналу

ДСТУ ISO 10018:2021 Управління якістю. Настанови щодо залучання персоналу (ISO 10018:2020, IDT) подає настанови, які впливають на залучення персоналу та його компетентність. Система управління якістю залежить від залучення компетентних осіб і від того, як їх подано та зінтегровано в організації. Критично важливим є визначати, розвивати та оцінювати знання, навички, поведінку та необхідне робоче середовище. На відміну від галузевих нормативів, універсальний за сферою призначення стандарт ДСТУ ISO 9001:2015 Системи управління якістю. Вимоги (ISO 9001:2015, IDT) містить вимоги стосовно персоналу у такому формулюванні: «Персонал, залучений до робіт, які впливають на відповідність продукції вимогам де неї, повинен бути

компетентним, тобто мати належну освіту, професійну підготовленість, навички та досвід». Також додається, що персонал, залучений до будь-яких робіт в межах системи управління якістю (СУЯ), може впливати на відповідність продукції вимогам до неї безпосередньо чи опосередковано. ДСТУ ISO 9001:2015 вимагає, щоб організація [39]:

а) визначала необхідний рівень компетентності для персоналу, залученого до робіт, які впливають на відповідність продукції вимогам до неї;

б) якщо це застосовно, забезпечувала проведення навчання або вживала інших заходів для досягнення потрібної компетентності;

в) оцінювала результативність вжитих заходів;

г) забезпечувала обізнаність персоналу щодо доцільності та важливості своєї діяльності та щодо свого внеску в досягнення цілей у сфері якості;

д) вела відповідні записи стосовно освіти, професійної підготовленості навичок і досвіду.

За результатами порівняння й узгодження відповідних вимог стандарту ДСТУ ISO 9001:2015 та ліцензійних вимог, до яких імплементовані вимоги GMP ЄС, можна зробити такі висновки [39]:

– підприємства з виробництва лікарських засобів (ПВЛЗ) має забезпечувати належну кваліфікацію і компетентність (за визначенням ДСТУ ISO 9000:2015 – доведена здатність застосовувати знання та вміння персоналу, робота якого прямо або опосередковано впливає на відповідність вимогам до продукції);

– ПВЛЗ має забезпечувати первинне та періодичне навчання персоналу;

– ПВЛЗ повинне мати затверджені навчальні програми, застосовні для підготовки персоналу, охопленого ФСЯ. Ці програми мають стосуватись теорії і прикладних аспектів застосування концепції забезпечення якості та GMP, а також специфічні фахові питання;

– ПВЛЗ має періодично оцінювати практичну ефективність навчання. Можна впевнено констатувати, що від правильності і повноти виконання цих вимог напряму залежить успіх впровадження фармацевтичної системи якості

(ФСЯ) та рівень «дієздатності» системи у подальшому. Отже, дослідження з визначення методів і засобів підготовки персоналу ПВЛЗ з питань управління якістю при формуванні і постійній підтримці ФСЯ слід визнати важливими і необхідними.

5.5. Підготовка обладнання та інвентарю

Підготовка обладнання як частина гігієнічної підготовки виробництва має на меті досягнення необхідної чистоти та стерильності.

Очищення обладнання.

Очищення обладнання відбувається наступним чином. Спочатку обладнання промивають водою протягом двох хвилин, після чого воду зливають у нейтралізаційний бак, а рідину зливають у систему зливу рідини. Потім обладнання промивають розчином каустичної соди з концентрацією 1-2% протягом 10 хвилин при температурі 40°С, після чого розчин повертають у бак для нейтралізації. Промивання питною водою слід проводити під час перекачування води в нейтралізаційний бак [40].

Якщо на поверхні обладнання є забруднення, які важко видалити, слід промити 1% розчином соляної кислоти при температурі 20°С і повернути розчин в бак нейтралізації.

Сучасні підприємства використовують механізовані системи очищення обладнання, такі як гідромонітори, для механічного очищення резервуарів і ємностей. Однією з таких систем є мийка ММ-4А і гідромонітори Г-13А. Вони спускаються в обладнання через люк в опорній системі та працюють під тиском 0,6. Внутрішні поверхні очищаються за допомогою струменя гарячої рідини під тиском 0,1 МПа. ММ-4А складається з нерухомого корпусу, обертового корпусу, приводного механізму, редуктора і соплового пристрою зі струменевою кермою. Корпус, який обертається, має різьбовий стакан для підключення шланга. Рух робочого колеса гідротурбіни, яке приводиться в дію миючою рідиною з максимальною температурою 80 °С, через вертикальний вал у черв'ячному редукторі, забезпечує обертання соплового пристрою. Останній складається з двох сопел з вихідним діаметром 11 мм зі швидкістю 0,03-0,04 с-1. Перед

виходом із сопел рідина проходить через струминний заспокоювач, що розширює діапазон струменя до 0,6...1,0 МПа. Витрата води може сягати до 30 м3/год протягом 20...25 хвилин [40].

5.6. Підготовка виробничих приміщень

Сертифікація ISO 22000:2018 системи управління безпечністю харчових продуктів. Вимоги до будь-яких організацій харчового ланцюга (ISO 22000:2018, IDT) охоплює всі елементи ланцюжка виробництва та постачання харчових продуктів, що впливають на безпеку кінцевого продукту. Стандарт визначає вимоги до систем менеджменту безпеки харчових продуктів та включає елементи належної виробничої практики (GMP), а також принципи HACCP (ХАССП – Аналіз небезпек та критичні контрольні точки) [41].

Виробничі приміщення, що підлягають санітарній обробці, включають підготовку сировини, виробництво таблеток, таблетування, фасування та пакування таблеток, навчання персоналу, зберігання спецодягу, допоміжних речовин, пакувальних матеріалів та мийні приміщення.

Стіни та стеля виготовлені з оцинкованого металу та покриті порошковою фарбою. Покриття підлоги не виділяє шкідливих речовин, а викиди твердих частинок зведені до мінімуму. Однією з основних вимог до цього покриття для підлоги є стійкість до звичайних хімічних речовин дезінфікуючих засобів. Стики між підлогою і стіною та стелею і стіною мають закруглені переходи, щоб уникнути утворення застійних, важкодоступних для прибирання ділянок [42].

Це робиться для того, щоб уникнути утворення застійних, важкодоступних для прибирання ділянок.

Щоденне прибирання панелі, стіни та двері виробничих приміщень щодня миють 2% розчином Хлорантоїну.

Щодня протирайте ганчіркою, змоченою в дезинфікуючому розчині ретельно слід протирати ручки та нижню частину дверей. Підлога в приміщенні викладена плиткою з ухилом у бік сходів. Всі роботи проводяться в захисних окулярах, гумових рукавичках, респіраторах і гумових фартухах. Виробничі, підсобні та побутові приміщення прибирають прибиральниці, тоді як робочі зони

прибирають самі працівники. Для виробничих приміщень, стін підлоги, вікон та дверей використовують Хлорантоїн та Дезекон (змінюють засіб кожні 3 місяці для уникнення утворення резистентних форм мікроорганізмів), для миття обладнання Каустичну соду та Біомой (зі зміною кожні 3 місяці). Об'єм дезінфікуючого розчину становить приблизно 100 мл на метр площі.

Генеральне прибирання. Генеральне прибирання приміщень проводиться один раз на місяць. Приміщення обробляють аналогічними дезинфікуючими розчинами, як і для щоденного прибирання. При виявленні грибків у повітрі приміщень концентрацію дезінфікуючого засобу в розчині слід збільшити, а при наявності мікроорганізмів - збільшити концентрацію перекису.

Виробничий процес включає ряд цехів: цех біосинтезу та вирощування інокуляту, качалочна кімната та лабораторія, де розташовані автоклави, центрифуги, бокси, термостати, холодильники та обладнання для проведення різних видів контролю (ваги, pH-метри та інше). Відстань між стінами та обладнанням складає 1,0 - 1,5 метра, а ширина проходів між ємностями становить 1 метр.

Габаритні розміри основного обладнання наведено у *табл. 5.3*.

Таблиця 5.3

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва

Обладнання	**Геометричний об’єм, л**
Ферментер	250
Інокулятор	30
Збірник-змішувач для зберігання сироватки	125
Реактор-змішувач для стерилізації сироватки	15/150
Збірник-змішувач для солей	10/100
Реактор-змішувач для стерилізації	50
Всього	730

За даними *табл. 5.3,* загальний об’єм реакторів-змішувачів та апаратів для вирощування посівного матеріалу і виробничого біосинтезу становить 0,73м^3.

Раз на місяць здійснюється генеральне прибирання (оброблюються стіни, підлога, вікна тощо), тобто 11 раз. Для розрахунку кількості миючих засобів необхідно розрахувати приблизну площу оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту 5 м. Площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить 48 м^2 (8×6 м), площа стін – [(5 ×8) + (5 × 6)] × 2 = 140 м^2, загальна площа – 48 + 280 = 188 м^2.

Загальну площу поверхні обробки мийними засобами наведено у *табл. 5.4.*

Оскільки миття обладнання відбувається перед кожним циклом, кількість процесів миття за весь період виробництва складає 120 (додаткове миття після останнього циклу.

Таблиця 5.4

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	**Площа підлоги, м^2**	**Площа стін, м^2**	**Загальна площа, м^2**
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	48	140	188
Мікробіологічна лабораторія	10	70	80
Загальна площа	**58**	**210**	**268**

Тоді загальний об’єм миття становитиме:

$$\mathbf{0{,}73 \times 120 \approx 88}\ м^2$$

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва наведено в *табл.5.5*

Таблиця 5.5

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об’єкту за весь період виробництва

Об’єкт миття та/або дезінфекції	**Площа (об’єм) Оброблюваного об’єкту, м^2**	**Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва**	**Загальна площа (об’єм) миття та/або дезінфекції об’єкту за весь період виробництва, м^2**
Обладнання	0,73	120	88
Підлога	58	331	19198
Стіни, двері, вікна	210	11	2310

Таблиця 5.6

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезинфікувальних засобів для біотехнологічного виробництва

Назва миючого /дезінфікуючого засобу	**Об'єкт миття/дезінфекції**	**Концентрація робочого розчину, %**	**Загальна площа (об'єм) миття/дезінфекції за весь період виробництва, м^2 (л)**	**Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л**	**Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн**	**Вартість 1 л робочого розчину, грн**	**Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн**
Каустична сода [43]	Обладнання, інвертар, комунікації, тара	1,0	88	17600	64	0,64	11264
Біомой [44]	Обладнання, інвертар, комунікації, тара	0,3	88	17600	350	1,05	18480
Дезекон [45] (композиція з 4-ьох амонієвих солей)	Підлога, стіни, вікна, двері	0,2	21508	2151	360	0,72	1549
Хлорантоїн [46] (дихлоранти)	Підлога, стіни, вікна, двері	0,2	21508	2151	724	1,45	3119

Згідно з отриманих даних та проаналізувавши представлені засоби для миття, пропонуємо по змінну схему їх застосування. Щоб уникнути розвитку та поширення стійких мікроорганізмів, рекомендується використовувати підряд обрані мийні засоби що три місяці. Тому для миття устаткування спочатку використовуємо КАУСТИЧНУ СОДУ, з подальшою зміною її на БІОМОЙ. Для миття поверхонь використовуємо миючій засіб ДЕЗЕКОН, з подальшим чергуванням з ХЛОРАНТОЇНОМ.

5.7. Обгрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Lactobacillus —рід грам-позитивний факультативний анаероб, нерухомий, каталазонегативний, не відновлює нітрати в нітрити, не розріджує желатину, слабко гідролізує ескулін, не утворює аміак з аргініну. Для біотехнологічних процесів, клітини продуцента не потребують вільного кисню, але він необхідний

для інших процесів, такі як: збільшення тиску у виробничому обладанні та перекачування посвіного матерілку з виробничих апаратів (через трубу перетискання). Для гомогенізації та рівномірного розподілу всієї композиції, періодично середовище перемішують на низькій швидкості за допомогою лопатевої мішалки (вмикати мішалку щогодини на 15-20 хвилин, при низьких її обертах) [47].

Однак, щоб підтримувати оптимальний тиск в обладнанні та мати змогу перекачати посівний матеріал з інокулятора до ферментера, ми використовуємо трубу перетискання (для підвищення тиску в обладнанні подають стерильне аераційне повітря).

Технічна система стиснення та очищення повітря складається з трьох послідовно з'єднаних підсистем. А саме: видалення пилу та стиснення, приведення повітря до термодинамічного стану з постійною температурою та вологістю з метою утворення аерозолів та розділення аерозолів за допомогою фільтрів грубого та тонкого очищення.

Стадія попереднього очищення або знепилювання повітря

На цій стадії з повітря віддаляється основна маса великих часток пилу розміром 5-10 мкм. В якості фільтруючих матеріалів у фільтрах попереднього очищення використовують багатошарові дротяні сітки, набивання зі стружок металів, з полімерних матеріалів, із грубих мінеральних і синтетичних волокон. До фільтрів цього класу ставляться масляні або вісцинові із промасленими металевими сітками. Масло сприяє осіданню часток пилу на фільтрі і їхньому втриманні. Змочувальні засоби, використовувані у вісцинових фільтрах, можуть бути бактерицидними, і осаджувані разом з пилом мікроорганізми втрачають здатність розмножуватися або гинуть [48].

В якості фільтрів попереднього очищення застосовуються також губчаті фільтри з модифікованого пінополіуретану. Ефективність уловлювання атмосферного пилу на пінополіуретані становить 50-85 %, його пилоємність - 0,2 кг/м2 . Гранична робоча температура використання пінополіуретану дорівнює 121 °С [48].

Стадія грубого очищення повітря

Ця стадія очищення здійснюється в головних фільтрах. Ефективність очищення повітря в головних фільтрах від часток діаметром 1 -1,5 мкм тобто бактеріальних забруднень повітря, досягає 98 % [48].

Широке поширення у якості фільтруючого матеріалу головних фільтрів одержали волокнисті матеріали. Волокнисті фільтри є фільтрами об'ємної дії, тому що вони розраховані на вловлювання й нагромадження часток не тільки на поверхні фільтруючого матеріалу, але й і глибині шару. Для фільтруючого матеріалу з певним діаметром волокна характеристики очищення можна змінювати, збільшуючи щільність упакування волокна у фільтрі або товщину шару матеріалу [48].

Стадія тонкого очищення повітря

На цьому етапі встановлені найвищі стандарти якості. Для відчищення повітря використовуються індивідуальні фільтри, які розміщуються перед кожним ферментором і повинні забезпечувати очищення повітря від частинок діаметром 0,3 мікрометра на 99,999%. Однією з особливих вимог, що ставиться до фільтруючих матеріалів на цьому етапі очищення, є необхідність їх регулярної стерилізації за допомогою гострої пари разом із всім обладнанням технологічної лінії [49].

Фільтруючі матеріали, що використовуються на етапі тонкого очищення, можна розділити на кілька груп: тонковолокнисті матеріали у формі матів, картону та паперу, зернисті тверді фільтруючі перегородки (такі як керамічні, металокерамічні, виготовлені з полімерних матеріалів) і мембранні фільтри. У промислових системах тонкого очищення повітря найчастіше використовуються тонковолокнисті фільтруючі матеріали [49].

5.8. Обгрунтування стадій виділення і очищення субстанції

Після процесу ферментації культуральне середовище містить мікроорганізми, продукти їх життєдіяльності, залишки культурального середовища, піногасники, розчинні та нерозчинні речовини. Цільовими продуктами біосинтезу можуть бути самі мікроорганізми або їх метаболіти,

розчинені в культуральному середовищі або містяться в клітинах мікроорганізмів [50].

При виборі методів виділення та концентрування продукту мікробіологічного синтезу необхідно враховувати наступні фактори:

1. *Фізико-хімічні властивості продукту*. Різні методи можуть бути більш або менш ефективними залежно від того, які саме речовини або компоненти потрібно виділити або концентрувати.
2. *Стійкість продукту до обробки*. Деякі продукти можуть бути чутливі до певних методів обробки, таких як висока температура або хімічні реагенти.
3. *Кінцева форма продукту*. Залежно від того, в якій формі потрібно отримати кінцевий продукт (наприклад, рідка речовина, порошок або кристали), обирають відповідний метод.
4. *Вимоги до чистоти та концентрації*. Іноді важливо отримати продукт з високим ступенем чистоти або великою концентрацією, що впливає на вибір методу.
5. *Технологічні обмеження*. Деякі методи можуть бути складними або дорогими у використанні, що важливо враховувати з погляду ефективності та економічності.
6. *Вимоги до біологічної активності*. Якщо важливо зберегти біологічну активність продукту (наприклад, активність мікроорганізмів), обирають методи, які мінімізують можливість її втрати.

Всі методи виділення продуктів мікробіологічного синтезу з культуральної рідини ділять на дві групи [50]:

- Екстракція, іонний обмін, адсорбція, кристалізація – якщо цільовий продукт в розчині.
- Осадження, фільтрування, центрифугування, сепарування – якщо цільовий продукт у вигляді твердої фази.

Для уникнення та мінімізації інактивації біологічного агента, такого як *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*, під час етапів виділення та очищення,

важливо обирати методи, що враховують оптимальні температурні межі для цього організму.

Тому, для виділення цільового продукту, будемо використовувати такі етапи виділення та очищення, як:

- Центрифугування
  - Отримання напівпродукту (змішування біомаси з захисним сахарозо – желатиновим середовищем)[51]**
- Висушування (сублімаційний метод висушування)
- Подрібнення готової субстанції (молоткова дробарка)
- Пакування (пакетики саше як первинна упаковка та картонні коробки для групового пакування)

Більш детальне порівняння даних етапів наведено нижче

***** Стабілізація лактобактерій у препараті з метою збільшення термінів збереження та якості препаратів — важлива технологічна стадія при розробці та виробництві препаратів, що визначає термін їх використання. Основний та найпоширеніший спосіб висушування — ліофільна сушка. Але для стабілізації самих клітин до складу препарату слід вводити речовини, які підтримують та підвищують основні терапевтичні функції лактобактерій. Згідно наведеної статті* [51], *використовуємо сахарозо – желатинове середовище, як оптимальне для збереження клітин родини лактобацил.***

5.8.1. Відокремлення біомаси (концентрування)

Для великих об’ємів виробництва, є два методи концентрування біомаси, які задовольняють наші потреби, а саме:

- Сепарування;
- Центрифугування

Сепаруваня називається розділення неоднорідних суспензій на фракції в полі відцентрових сил. Розрізняють відстійне і фільтраційне центрифугування.

Центрифугуванням називається процес розділення неоднорідних рідинних сумішей на фракції, які відрізняються за щільністю, в полі дії відцентрових сил.

Більш детальна інформація переваг та недоліків наведені у *таблиці 5.7.*

Таблиця 5.7

Порівняльна характеристика способів концентрування біомаси

Спосіб	Переваги	Недоліки
Сепарування	-максимальне очищення культуральної рідини від біомаси та залишків компонентів ПС; -відсутність необхідності попередньої обробки КР; -висока продуктивність;	-Більш складне та дороге обслуговування
Центрифугування	-порівняно малі втрати біомаси; -перспективність у автоматизуванні процесу; -малі габарити обладнання та вага;	-вартість обладнання;

Порівнюючи вище описані методи концентрування, мій вибір залишається на центрифугуванні, оскільки цей метод має більше переваг у порівнянні з сепаруванням. Головні переваги центрифугування – це продуктивність і високий ступінь концентрації, що дозволяють успішно конкурувати з іншими методами виділення і концентрування як у промислових, так і в лабораторних умовах.

5.8.2 Обгрунтування вибору способу приготування кінцевої форми продукту

Перед процесом сушіння, готовий напівпродукт змішують з захисним середовищем у спеціальній ємності. Після рівномірного розподілу захисного середовища з клітинами, його готують до наступного виробничого етапу — сушіння.

Сушіння - це процес видалення рідини (вологи) з твердих та рідких матеріалів (продуктів, препаратів). Цей процес зазвичай здійснюється за допомогою сушильних установок різного типу. У біотехнологічному виробництві використовуються різноманітні сушарки, що дозволяють висушувати дуже різні матеріали.

Для отримання сухого концентрату можуть застосовуватися такі методи сушіння, як:

– Розпилювальне сушіння;

– Сублімація.

Розпилювальне сушіння - це процес, під час якого рідкий продукт подається в сушильну камеру і розпилюється за допомогою швидкоповоротного диску або форсунки. Одночасно у камеру подається гаряче повітря, яке попередньо очищене в батареях циклонів та скруберах. Камери для сушіння зазвичай виготовляються із нержавіючої сталі, і можуть мати плоске або конічне дно. У камерах з плоским дном передбачений механізм для вивезення сухого продукту. У той час як у камерах з конічним дном, висушений продукт у вигляді порошку видаляється за допомогою сили тяжіння [52].

Сублімацію застосовують у випадках, коли інші методи сушіння не можуть забезпечити потрібні якісні характеристики продукту. Під час процесу сублімаційного сушіння волога виділяється у вигляді пари при температурі, нижчій за точку замерзання вологи, що міститься в матеріалі. Це дозволяє зберегти термолабільні речовини практично незмінними, а мікробіологічні процеси гальмується. Оскільки випарована волога не містить розчинних речовин, внутрішній перенос розчинників відсутній. Сублімація льоду супроводжується віднесенням парів розчинних летких складових частин продукту [52].

Більш детальна інформація переваг та недоліків наведені у *таблиці 5.8.*

Таблиця 5.8

Порівняльна характеристика способів сушіння субстанції

Спосіб	**Переваги**	**Недоліки**
Розпилювальне сушіння	-Висока продуктивінсть процесу.	- Ризик інактивації клітин. - Великі питомі габарити установок
Сублімація	- Процес випарювання відбувається при низькій температурі, - Завдяки низькій температурі відсутня небезпека мікробіологічного зараження. - У висушуємо продукту залишається менше 1% вологи, тому його можна довго зберігати.	- Процес сушіння розтягнутий у часі - Вартість кінцевого продукту

Беручи до уваги той факт, що кінцевою формою мають бути висушена субстанція живих клітин, то для мінімізації ризиків обираємо метод сублімації. Даний спосіб є більш надійним для збереження нативної природи клітин.

5.8.3. Обгрунтування способу подрібнення субстанції та її просіювання

Для етапу подрібнення субстанції пропонуємо такі методи як:

– Молотова дробарка;

– Вібраційний метод подрібнення.

Більш детальна інформація переваг та недоліків наведені у *таблиці 5.9*

Спосіб	Переваги	Недоліки
Молоткова дробарка	-Висока продуктивінсть. - Якість подрібнення. - Універсальність. - Можливість регулювання	- Зношування молотків
Вібраційний метод подрібнення	- Можливість регулювання	- Продуктивність поцесу. - Гучність та вібрація

Для етапу подрібнення використовуємо оптимальний метод з використанням невеликої фармацевтичної молоткової дробарки (приклад такої дробарки зображено на *рис. 3.1*). Після процесу подрібнення субстанцію просіюють на вібраційному ситу. Відсів не відповідного розміру повторно подрібнюють та просіюють.

chumaki.in.ua

Рис 5.2. Подрібнювач YF8-1

5.8.4. Фасування готової субстанції

Оскільки, дана субстанція буде використовуватись для виробництва біологічної добавки, то подальше транспортування та затрати треба мінімізувати. Доцільно є використання не дорогих методів фасування та вибору упаковки. Первинна упаковка має захистити продукт від зовнішніх факторів та впливу. Такою упаковкою може бути пакетики саше з застібкою. Загальний вигляд наведено на рисунку 3.1.

Рис. 5.3. Пакетик саше

Пакети-саше - це плоскі тришовні пакетики зручного та компактного розміру, ідеальні для фасування невеликих обсягів продукції. Основна перевага цієї упаковки полягає в її простоті механізації пакувального процесу, що полегшує транспортування, зберігання та реалізацію продукції. Крім того, вони дуже зручні у використанні та мають бар'єрну стійкість до мікроорганізмів [53].

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

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

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ – 1	Повітрозабірник	1	Проточні повітрозбірники серії 5.903-20 і 5.903-2, які належать до типу А1І, встановлюються як горизонтально, так і вертикально. Температура повітря до 150 ° С; тиск до 0,6 МПа Виробник: Україна [54]
Ф – 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтруючий матеріал – поліестер, швидкість фільтрування 3 м³/год, Е = 80 %[55].
К − 3	Компресор	1	Компресор серії «ВКП F Industrial» .Кількість циліндрів/ступенів стиснення 2/2 Продуктивність, вхід л/хв 500 Продуктивність, вихід л/хв: 330 Тиск нагнітання (мах), атм 10 Потужність приводного електродвигуна, кВт 3,0 Напруга живлення, 380 Маса (кг) 122 Виробник: Україна[56].
ТО – 4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Витрата: до 640 м³/год Робочий тиск: 140 атм. Температура: -195 ° С- +220 °С Нержавіюча сталь AISI 316 Виробник: Швеція [57].

Продовження табл. 6.1

Р – 5	Ресивер	1	Виробник: FIAC Країна виробник: Італія Ресивер: 500 літрів Ø з'єд-ний діаметр: 3/4" Тиск: 15 бар Висота: 2160 мм Діаметр ресивера: 660 мм Вага: 152 кг[58].
ТН – 6	Теплообмінник-нагрівач	1	Кількість повітря, м3/год: 7500 Необхідна теплова потужність, кВт (від –100С до +200С): 80 кВт Виробник: Україна[59].
Ф – 7	Фільтр тонкої очистки	1	Компактний кишеньковий фільтр класу F9 («New filter»). Фільтрувальний матеріал: мікроскловолокно; Е>95% [60].
УФУ – 8	Ультрафільтраційна установка	1	Промислові системи ультрафільтрації ECOSOFT UF продуктивністю 30 м 3 /год [61].
НВ – 10 НВ – 20	Насос відцентровий	2	Циркуляційний насос Grundfos Насос відцентровий герметичний , матеріал чугун. Продуктивність від 3,2 м3 /год, Максимальний тиск – 10бар. Виробник: Данія[62].
ЗЗ-9	Збірник - змішувач	1	Збірник-змішувач об’ємом 125л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі AISI 316L. Виробник: Україна [63].
ЗЗ-13	Збірник - змішувач	1	Збірник-змішувач об’ємом 10л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі AISI 316L. Виробник: Україна [64].
ЗЗ-14	Збірник - змішувач	1	Збірник-змішувач об’ємом 100л,. Виконаний з нержавіючої сталі AISI 304 **Загальні габарити:** Ширина: 550мм Висота: 1200мм Довжина: 1600 мм Загальний об'єм реактора: 120л Робочий об'єм: 100л Комплектація: Рама на колесах Мотор редуктор Тен 4кВт Мішалка вертикальна Ящик управління нержавіючий Частотний регулятор Виробник: Україна [65].

Продовження табл. 6.1

РЗ-11	Збірник - змішувач	1	Реактор – змішувач 15 л. Виконаний з нержавіючої сталі технічних AISI 304 або AISI 316. Оснащений теплоізольованою сорочкою нагріву, приводом обертання, вузлом ущільнення, валом з рамною мішалкою і щитом управління. Ємність реактора має герметичні вузли завантаження та вивантаження. Щит управління, обладнаний датчиком-регулятором нагріву, частотним перетворювачем, кнопками запуску і зупинки перемішуючого пристрою, кнопками запуску і зупинки насоса (встановлюється додатково), кнопкою аварійної зупинки і системою захисту управління двигуна. Виробник: Україна [66].
ЗЗ-12	Збірник - змішувач	1	Реактор – змішувач 150 л. Всі частини реактора, що контактують з продуктом, виготовлені зі сталі AISI 316L. Реактор обладнаний теплообмінною та теплоізолюючою сорочками, рамною мішалкою та донним клапаном Dn80. Корпус реактора розрахований на атмосферний тиск, і обладнаний кришкою, що знімається, 3-я частина якої відкидається для введення компонентів. Теплообмінна сорочка розрахована під перегріту пару тиском 5 бар. Виробник: Україна [67].
ЗЗ-15	Збірник - змішувач	1	Реактор – змішувач 50 л. Всі частини реактора, що контактують з продуктом, виготовлені зі сталі AISI 316L. Реактор обладнаний теплообмінною та теплоізолюючою сорочками, рамною мішалкою та донним клапаном Dn80. Виробник: Україна [68].

Закінченняя табл. 6.1

ІН-16	Інокулятор	1	Необхідний простір Підлогова версія 1900 х 1020 х 750 мм (максимально) Керуючий ПК промислового типу Основний пристрій Матеріал корпуса нержавіюча сталь AISI 304, 316L З'єднання з комп'ютером локальна мережа Робочі параметри 30 л Швидкість обертання мішалки 20–600 об/хв Температура: 0–150°C pH: 2–12 pO2: 0-100% Тиск: (-0,5) - 2 бар (опція) Мутність 0–6 AU (опція) Red/Ox-потенціал -2000 - 2000 мВ (опція) Виробник: Україна [69].
Ф-17 Ф-19	Індивідуальний фільтр очистки повітря	2	Стерилізуючі фільтри з політетрафторэтилена. Ступінь очищення повітря фільтром становить 99,9999 %.[70].
ФР-18	Ферментер	1	Виробничий ферментер геометричний об’єм 250л, швидкість перемішування 20–1500об/хв. Контроль температури, pH, тиску Необхідне контрольно-вимірювальне обладнання Система аерації Габарити реактора: 1500х1135х3122 Маса:630кг Матеріал корпуса: сталь AISI 316 L Виробник: Китай [71].

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

Повітря, яке використовується для збільшення тиску в апаратах, а також для перекачування посівного матеріалу з інокулятора до ферментера, повинно бути стерильним та мати температуру 30–35°С.

Перед тим, як повітря потрапляє до ферментеру, воно проходить повну очистку та стерилізацію, в результаті якої звільняється від мікроорганізмів.

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір повітря здійснюється повітрозбірником (ПЗ-1) Повітря збирають з висоти приблизно 20-30 м.

Потім повітря через повітрозабірну шахту під дією компресора потрапляє до фільтру попереднього очищення (ФГО-2).

ДР 1.2. Очищення від пилу і механічних часток.

На стадії попереднього очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром 150-300 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення використовують фільтри грубої очистки – ФЯП. Який складається з рамки, виготовленої з оцинкованої сталі, усередині якої покладений об'ємний фільтруючий матеріал (поліуретан) (ФГО-2).

Ефективність очищення повітряними фільтрами ФЯП становить 80 %.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Стисненння повітря здійснюється у компресорі (К-3) при тиску 0,35–0,5 МПа, при цьому температура може підніматися до 200°С.

ДР 1.4. Охолодження та видалення вологи

Повітря «переохолоджують» до температури 25–40 °С в теплообміннику-охолоджувачі (ТО-4). При охолоджені стисненого повітря випадає 50 – 70 % вихідної вологи, яка відділяється вологовідділювачами.

ДР 1.5 Стабілізація та нагрівання повітря

Для забезпечення надійної роботи головного і індивідуального фільтрів, повітря нагрівають до температури до 60°С в теплообміннику-нагрівачі (ТН-5).

ДР 1.6. Очищення в головному фільтрі

Подальше очищення повітря відбувається у головному фільтрі (Ф-7). Для головних фільтрів використовується фільтр ФТО-750 з ефективністю Е = 99,92 %.

ДР 1.7. Очищення в індивідуальному фільтрі

Для індивідуального очищення повітря використовується фільтр тонкої очистки Ф-, Ф-, Ф-.Стерилізацію фільтруючого матеріалу проводять парою при температурі 145 °С. Отримуємо стерильне аераційне повітря зі ступенем очищення – 99,9999 %.

ДР 2. Приготування, стерилізація та зберігання титрувальних агентів

**Оскільки у процесі біосинтезу продуцента утворюється молочна кислота (яка знижує pH середовища від оптимальних умов), а також ми проводимо спільну стерилізацію солей, то ж ми враховуємо це у загальних об'ємах приготування титрувальних розчинів, а також їх підбору.*

ДР 2.1 Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH 6% для інокулятора 30л.

Для корегування pH необхідно приготувати титрувальний розчин з розрахунку 2мл/л культуральної рідини.

m(NaOH)= $\frac{56\times6}{100}$ = 3,36г (потрібно для приготування 6 % NaOH об'ємом 36мл + 20мл = 56мл)

На технічних вагах зважують **3** г NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 150 мл, і відміряють за допомогою мірника 56 мл води питної, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

ДР 2.2 Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH 6% для ферментера 250 л.

Для корегування pH необхідно приготувати титрувальний розчин з розрахунку 2мл/л культуральної рідини.

m(NaOH)= $\frac{560\times6}{100}$ = 33,6г (потрібно для приготування 6 % NaOH об'ємом 360мл + 200 мл = 560мл)

На технічних вагах зважують **34** г NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 1500 мл, і відміряють за допомогою мірника 560 мл води питної, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

ДР 2.3 Підготовка титрувального агенту HCI 6% для інокулятора 30 л

Розчин HCl готують змішуванням концентрованої HCl з дистильованою водою. Розрахунок кількості 36 % HCI необхідної для приготування титрувального агента (концентрацією 6 %, об'ємом 36мл):

0,36х = 0,06 × 36

0,36х = 2,16

х = 6 мл (36% – ї HCI)

Приготування кислоти відбувається у колбі об'ємом 150мл.

За допомогою мірника відміряють 6 мл концентрованого 36% розчину HCI, та поміщають у колбу об'ємом 100 мл, і додають за допомогою мірника 36 мл дистильованої води, ретельно перемішують.

ДР 2.4 Підготовка титрувального агенту HCI для ферментера 250 л.

Розчин HCl готують змішуванням концентрованої HCl з дистильованою водою. Розрахунок кількості 36 % HCI необхідної для приготування титрувального агента (концентрацією 6 %, об'ємом 360мл):

0,36х = 0,06 × 360

0,36х = 21,6

х = 60 мл (36% – ї HCI)

Приготування кислоти відбувається у колбі об'ємом 750 мл. За допомогою мірника відміряють 60 мл концентрованого 36% розчину HCI, та

поміщають в колбу об’ємом 750 мл, і додають 360 мл дистильованої води, ретельно перемішують.

ДР 2.5 Зберігання аміачної води

2мл/л × 18л = 36 мл(без запасу)

36 × 2 = 72мл – для інокулятору 30л

2мл/л × 180л = 360 мл (без запасу)

360 × 2 = 720 мл – для ферментера 250л

Загалом: 72 + 360 = 432мл ≈ 500 мл. Для використання потрібно 500л *NH4OH*. Розчин подається зі складу у ємність при виробничому устаткуванні (інокуляторах та ферментері) для автоматичної системи контролю pH. Титруючий розчин зберігається на складі, до подальшого використання.

ДР 3. Попередня підготовка компонента поживного середовища

ДР 3.1 Депротиїнізація молочної сироватки

Перед початком стерилізації молочної сироватки її депротинізують, за допомогою *ультра фільтраційної установки (УФУ – 8)*. Продуктивність даної установки становить 150л/год, а працює при тиску 2Атм. Після етапа очистки молочна сироватка подається на зберігання, для подальших етапів у збірник – змішувач (ЗЗ - 9) об’ємом 125 л. Після цього депротеїнізованумолочну сироватку, за допомогою відцентровго насосу (НВ – 10) подають на стадію стерилізації.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках наведений у табл. 2.1 (розділ 2). Розрахунок здійснений для приготування середовища об’ємом 2 л. Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою мірника (із загальної системи пілготовки молочної сироватки) відбирають та відміряють 1,5 л депротиїнізованої молочної

сироватки. Наважку переносять у бутль об'ємом 4 л. Бутль закривають ватно-марлевою пробкою і здійснюють стерилізацію в автоклаві при 121°С, 15 хв.

ДР 4.1.2. Приготування та стерилізації композиції Б

На технічних вагах зважують 100 г лактози, 20 г дріжджового екстракту та 20 г пептону. Наважки переносять у колбу об'ємом 750 мл та мірникмом додають 400 мл питної води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і здійснюють стерилізацію в автоклаві при 112°С, 30 хв.

ДР 4.1.3. Приготування та стерилізації композиції В

На технічних вагах зважують 4 г KH_2PO_4. Наважку переносять у колбу об'ємом 50 мл та мірником додають 20 мл водопровідної води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і здійснюють стерилізацію в автоклаві при 131°С упродовж 40 хвилин.

ДР 4.1.4. Приготування та стерилізації композиції Г

На технічних вагах зважують 10 г $C_2H_3NaO_2$, 0,4 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,1 г $MnSO_4 \times 4H_2O$ та 0,06 г $FeSO_4 \times 7H_2O$. Наважку переносять у колбу об'ємом 50 мл та мірником додають 30 мл водопровідної води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і здійснюють стерилізацію в автоклаві при 131°С упродовж 40 хвилин.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 30 л.

На даному етапі необхідно отримати 20 л поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу з минулої стадії (2 л) кількість води для приготування поживного середовища становитиме 18л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л наведений у табл. 2.2 (розділ 2). Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою лічильника для води відміряють 9 л депротиїнізованої молочної сироватки. Наважку переносять в реактор – змішувач (РЗ – 11) об'ємом

15л. Стерилізацію композиції здійснюють гострою парою. Подача пари відбувається через нижній спуск апарату. Температура стерилізації – 121°С, 15 хв з моменту досягнення температури стерилізації. Тоді, стерильну *композицію* А самопливом подають до інокулятору.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізації композиції Б

На технічних вагах зважують 1000 г лактози, 200 г дріжджового екстракту та 200 г пептону. Наважки переносять у бутль об'ємом 5 л та мірником додають 3 л питної води. Бутль закривають ватно-марлевою пробкою і здійснюють стерилізацію в автоклаві при 112°С, 30 хв.

ДР 4.2.3. Приготування та стерилізації композиції В

На технічних вагах зважують 40 г KH_2PO_4, 100 г $C_2H_3NaO_2$, 4 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, 1 г $MnSO_4 \times 4H_2O$ та 0,6 г $FeSO_4 \times 7H_2O$. Наважку переносять у збірник - змішувач (ЗЗ – 13) об'ємом 10 л, та за допомогою лічильника для води додають 4,5 л водопровідної води перемішують. Потім готовий розчин самопливом подають до інокулятора. Стерилізація композиції В буде відбуватись безпосередньо в інокуляторі. Перед стерилізацією розчин солей підкислюють розчином HCl (від ДР 2.3) до pH 4 (для унеможливлення утворення осаду солей). Стерилізацію композиції здійснюють гострою парою. Подача пари відбувається через нижній спуск апарату. Температура стерилізації – 131°С, 40 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера 250 л

Для цієї стадії необхідно отримати 198 л поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу з минулої стадії (18 л) кількість води для приготування поживного середовища становитиме 180 л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для виробничого культивування у ферментері об'ємом 250 л наведений у табл. 2.3 (розділ 2). Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою лічильника для води відміряють 90 л депротиїнізованої молочної сироватки. Наважку переносять у реактор – змішувач (РЗ – 12) об'ємом 150л. Стерилізацію композиції здійснюють гострою парою. Подача пари відбувається через нижній спуск апарату. Температура стерилізації – 121°С, 15 хв з моменту досягнення температури стерилізації. Тоді, стерильну *композицію* А самопливом подають до виробничого ферментеру.

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізації композиції Б

На технічних вагах зважують 9900 г лактози, 1980 г дріжджового екстракту та 1980 г пептону. Наважку переносять у реактор - змішувач (РЗ – 15) об'ємом 50 л, та за допомогою лічильника для води додають 27 л питної води перемішують. Стерилізацію композиції здійснюють гострою парою. Подача пари відбувається через нижній спуск апарату. Температура стерилізації – 112°С, 30 хв з моменту досягнення температури стерилізації. Тоді, стерильну *композицію* Б самопливом подають до ферментеру.

ДР 4.3.3. Приготування та стерилізації композиції В

На технічних вагах зважують 396 г KH_2PO_4, 990 г $C_2H_3NaO_2$, 40 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, 10 г $MnSO_4 \times 4H_2O$ та 6 г $FeSO_4 \times 7H_2O$. Наважку переносять у збірник - змішувач об'ємом (ЗЗ – 14) 100 л, та за допомогою лічильника для води додають 45 л водопровідної води перемішують. Потім готовий розчин самопливом подають до виробничого ферментера. Стерилізація композиції В буде відбуватись безпосередньо у ферментері. Перед стерилізацією розчин солей підкислюють розчином HCl (від ДР 2.4) до pH 4 (для унеможливлення утворення осаду солей). Стерилізацію композиції здійснюють гострою парою. Подача пари відбувається через нижній спуск апарату. Температура стерилізації – 131°С, 40 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* PTCC1737 зберігають на скошеному агаризованому MRS при 4 °С. Через кожні 3 місяці

проводять пересіви, роботи з культурою відбуваються в строго асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

В асептичних умовах використовуючи бактеріологічну петлю колекційну культуру методом виснажувального штриха розсівають на чашки Петрі з агаризованим середовищем (MRS) з метою отримання ізольованих колоній. Чашки поміщають в термостат, інкубують впродовж 48 год при 40 ºС.

ТП 5.3. Вирощування культури на агаризованому середовищі

Ізольовані колонії, в строго асептичних умовах, отримані на попередній стадії (*від ТП 4.2*), бактеріологічною петлею, пересівають в пробірки з агаризованим середовищем MRS (одну колонію використовують для засіву однієї пробірки). Ізольовані колонії (відстань яких не менше 1 см) пересівають в пробірки, інкубування проводять в термостаті при 40 ºС впродовж 48 год.

ТП 5.4. Вирощування культури в колбах на качалках

В асептичних умовах у бутль об'ємом 4 л зі стерильною *композицією А* (від ДР 4.1.1) вносять простерилізовану *композицію Б* (від ДР 4.1.2) *композицію В* (від ДР 4.1.3) та композицію Г (від ДР 4.1.4). Після цього у поживне середовище вносять посівний матеріал (від ТП5.3, який спочатку суспендують з додаванням стерильного фізіологічного розчину) та перемішують. Готову суміш і розливають по 400 мл у 5 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл. Вирощують посівний матеріал при 37°С упродовж 48 год.

ТП 5.5. Вирощування в інокуляторі 30 л

В інокулятор зі стерильною *композицією В* (*від ДР 4.2.3*) через засівну колбу вносять *композицію Б* (від *ДР4.2.2*) та самопливом, з реактора – змішувача, подають *композицію А* (від *ДР4.2.1*). Вмикають мішалку, вносимо 6% розчин лугу (від ДР2.1) для доведення оптимального рівня pH 6 (контроль здійснюється за рахунок автоматичної системи pH вимірювання). Після цього вносять посівний матеріал через засівну колбу (від від *ТП 5.4.*). Всі операції проводять в асептичних умовах. Вирощування культури в інокуляторі відбувається без подачі аераційного повітря оскільки даний штам є анаеробом. Тривалість

культивування становить 48 години, t=37°С та pH 6. Підтримка оптимального рівня pH відбувається автоматичною системою титрування інокулятора (шляхом подачі готового 25% розчину NH_4OH).

ТП 6. Біосинтез

ТП 6.1. Виробниче культивування

У виробничий ферментер (ФР – 18 (250 л)) зі стерильною *композицією В* (*від ДР 4.3.3*) самопливом, з реактора – змішувача, вносять *композицію Б* (від *ДР4.3.2*) та самопливом, з реактора – змішувача вносять *композицію А* (від *ДР4.3.1*). Вмикають мішалку, вносимо 6% розчин лугу (від ДР 2.2) для доведення оптимального рівня pH 6 (контроль здійснюється за рахунок автоматичної системи pH вимірювання). Після цього вносять посівний матеріал через трубу перетискання (від від *ТП 5.5.*). Всі операції проводять в асептичних умовах. Вирощування культури у виробничому ферментері відбувається без подачі аераційного повітря оскільки даний штам є анаеробом. Тривалість культивування становить 48 години, t=37°С та pH 6. Підтримка оптимального рівня pH відбувається автоматичною системою титрування інокулятора (шляхом подачі готового 25% розчину NH_4OH від ДР 2.5).

Культивування припиняють за досягнення в культуральній рідині біомаси 5,1 г/л.

Кожні 4 год з ферментера відбирають 20 мл зразку культуральної рідини для мікробіологічного аналізу.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

У процесі біосинтезу проводять періодичний контроль таких параметрів: концентрація біомаси, джерел вуглецю та азоту. Також проводять постадійний контроль.

8.1. Мікробіологічний контроль

Культивування *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* PTCC177 для виробництва пробіотиків здійснюється в асептичних умовах, і мікробіологічний контроль повинен здійснюватися на всіх етапах, щоб гарантувати відсутність забруднення сторонньою мікрофлорою.

Кожні 4 години з ферментатора відбирають 20 мл зразка культури і аналізують його.

Мікробіологічний контроль здійснюється двома способами: мікроскопічне дослідження та посів на агарові середовища.

Мікроскопічне дослідження проводять під оптичним мікроскопом. Для виконання препарату на чисте, знежирене предметне скло в асептичних умовах за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплю живильного середовища. Краплі, що містять мікроорганізми, розподіляють на склі за допомогою бактеріальної петлі (діаметр мазка приблизно 1 см). Мазок сушать при кімнатній температурі без нагрівання до повного випаровування води. Після чого мазок фарбуємо за Грамом. Потім на повністю висушений препарат за допомогою скляної палички додають одну-дві краплі імерсійної олії. Повинні бути видні тільки клітини біологічного агентт *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* PTCC177*:* грам позитивні, середньої довжини і товщини з округлими краями, рівні палички розміром від 0,5 до 3-8мкм, можливе розташування ланцюжками різної довжини від 2 до 6-8 клітин.

Після роботи ватою, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки олії з імерсійного об’єктива.

Для визначення мікробіологічної чистоти культури висівають на чашки Петрі, вистелені м'ясо-пептонним агаром (МПА) для бактерій (інкубують при 42 ± 2°С протягом 24-48 годин) і на пластини, вистелені сусло-агаром (СА) або глюкозно-картопляним агаром (GPA) для дріжджів і грибів (інкубують при 42 ± 2°С протягом 7 днів). Для цього в асептичних умовах відберіть 0,1 мл суспензії і внесіть у чашку Петрі. Нагрійте і охолодіть, приклавши шпатель Дригальського до кришки чашки Петрі. Потім акуратно розподіліть шпателем суспензію по всій поверхні середовища. Переверніть чашку Петрі, загорніть її в папір і помістіть в термостатичний інкубатор. Після інкубації чашку виймають з інкубатора і візуально оцінюють культури на наявність потороннього мікрофлори [72].

Кількості життєздатних клітин проводять висівом на чашки Петрі з середовищем МРС методом послідовних десятикратних розведень (метод Коха). Культивування триває 24 год за температури 42°С.

Для аналізу в асептичних умовах відбирають 1 мл клітинної суспензії і поміщають у 9 мл стерильної водопровідної води або фізіологічного розчину, потім послідовно новою піпеткою переносять по 1 мл у ряд пробірок з 9 мл стерильної водопровідної води. З одержаних (попередньо ретельно перемішаних) розведень здійснюють висів на поверхню агаризованого середовища у чашки Петрі. Висів здійснюють по 0,1 мл, починаючи з найбільшого розведення. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні агаризованого середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Для кожного розведення використовують нову стерильну піпетку і новий стерильний шпатель. Чашки Петрі поміщають у термостат, Культивування триває 24 год за температури 42°С. Після закінчення культивування колонії підраховують (автоматичним лічильником колоній)[73].

8.2. Показники росту і синтезу

У процесі біосинтезу проводять періодичний контроль таких параметрів: концентрація біомаси, джерела вуглецю та азоту. Також проводять постадійний контроль.

Концентрація біомаси

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії (непрямий метод), на фотоелектроколориметрі з довжиною хвилі 540 нм в кюветах з товщиною 0,5см, з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка [74].

8.3 Визначення концентрації джерела азоту

Вміст амінного азоту в культуральній рідині визначають мідним способом. Визначення амінного азоту мідним способом грунтується на здатності амінокислот і різних пептидів утворювати комплексні розчинні сполуки з міддю, яку потім визначають йодометрично.

Принцип методу полягає в тому, що до визначеної кількості досліджуваного розчину, який містить суміш амінокислот і пептидів, приливають при слаболужній реакції надлишок суспензії фосфорнокислої міді у боратному буфері, в результаті чого після збовтування у розчин переходять мідні солі більшості амінокислот. Потім надлишок фосфату міді відфільтровують і до прозорого розчину додають оцтову кислоту і йодистий калій. При цьому відбувається реакція:

$$2Cu(CH3COO)2 + 4KI = 2CuI + I2 + 4CH3COOK$$

Йод, що виділився відтитровують слабким розчином тіосульфату. Кожен мілілітр 0,01 н. Na2S203 відповідає 0,28 мг амінного азоту.

Проведення аналізу. 10 мл супернатанту культуральної рідини, доведеного до нейтральної реакції, наливають у мірну колбу на 25 мл і додають одну-дві краплі тимолфталеїну і по краплях 1 н. розчину NaOH до блідо-синього забарвлення. Після цього у колбу додають 10-15 мл суспензії ортофосфату міді у боратному буфері, потім доводять вміст колби до мітки дистильованою водою.

Добре зботвують і фільтрують через складчастий фільтр з малопористого фільтрувального паперу або центрифугують.

Фільтрат повинен бути зовсім прозорий, бо за наявності частинок осаду завищується кінцевий результат.

5-10 мл фільтрату відбирають у конічну колбу або у фарфоруву чашку, додають 0,25 – 0,5 мл 80% оцтової кислоти, 0,2 – 0,4 г KI. Йод, що виділився, відтитровують 0,01 н. розчином тіосульфату Na2S2O3 , додаючи в кінці титрування одну-чотири краплі крохмалю до зникнення синього забарвлення. Паралельно проводять контрольний дослід, де замість досліджуваного розчину беруть дистильовану воду.

Результат обчислюємо за формулою

$$X = \frac{(a - в) \cdot 0{,}28}{n}$$

де X – вміст амонійного газу, 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, яка взята для аналізу, мл.

Стандартизація складу поживного середовища буде проводитися за вмістом амінного азоту, оскільки джерело карбону додається в надлишку [75].

8.4 Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом вуглецю в даному середовищі є лактоза (молочний цукор).

Концентрацію лактози визначаємо за допомогою лактозного біосенсора

Методика вимірювання

Вимірювання проводять у калій-фосфатному буферному розчині різної молярності за різних значень pH при кімнатній температурі у відкритій комірці з інтенсивним перемішуванням. Спочатку сенсор розміщували у комірці для вимірювання об'ємом 2 мл. заповненій фосфатним буферним розчином. Для одержання стабільного початкового сигналу (базової лінії) сенсор вимочували деякий час у буферному розчині. Потім для отримання сигналу на субстрат необхідної концентрації в комірку додавали певну аліквоту стандартного

концентрованого вихідного розчину субстрату. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливанням температури, pH середовища, коливаннями напруги в мережі, нівелювалися завдяки використанню в роботі диференційного режиму вимірювань, тобто вимірювали різницю сигналів із двох пар електродів 3 активною та неактивною мембраною, розташованих на одному перетворювачі.

В основі роботи кондуктометричної біосенсорної системи для визначення лактози лежить каскад ферментативних реакцій:

$$\text{Лактоза} + H_2O \xrightarrow{\beta\text{-ГАЛ}} \text{галактоза} + \text{+ } \alpha\text{-D-глюкоза}; \quad (1)$$

$$\alpha\text{-D-глюкоза} \xrightarrow{\text{МУТ}} \beta\text{-D-глюкоза}; \quad (2)$$

$$\beta\text{-D-глюкоза} + O_2 \xrightarrow{\text{ГОД}} \text{D-глюконолактон} + \text{+ } H_2O_2; \quad (3)$$

$$\Downarrow$$

$$\text{D-глюконова кислота} + H_2O \rightleftarrows \rightleftarrows \text{залишок кислоти} + H^+, \quad (4)$$

де β-ГАЛ - β-галактозидаза, МУТ -мутаротаза, ГОД-глюкозооксидаза.

β-Галактозидаза, мутаротаза та глюкозооксидаза поетапно розщеплюють лактозу до пероксиду водню та D-глюконолактону. Глюконолактон, у свою чергу, спонтанно гідролізується до глюконової кислоти, яка дисоціює на залишок кислоти і протон, при цьому змінюється провідність розчину, яку й можна реєструвати за допомогою кондуктометричного перетворювача.

Оскільки лактозний сенсор дає відгук і на глюкозу, і на лактозу, для визначення саме лактози необхідною е наявність також глюкозного сенсора. У зв'язку із цим вимірювання лактози в зразках слід проводити у два етапи. Спочатку визначаємо концентрацію глюкози в зразку глюкозним сенсором, а потім - сумарну концентрацію лактози - глюкози у досліджуваному розчині за допомогою лактозного сенсора. Різниця цих двох концентрацій відповідає концентрації лактози в розчині [76].

8.5. Карта постадійного контролю

Таблиця 8.1.

Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Кт 1.2 Очищення від пилу і механічних часточок	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	Е = 80 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Стиснення повятря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	Р=0,35–0,5 МПа t=200 ˚С
Кт 1.4 Охолодження та видалення вологи	Охолоджене повітря	Термометр технічний	Під час проведення операції	t = 25-40°С W=50-70°
Кт 1.5 Стабілізація та нагрівання	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 60 °С
Кт 1.6 Очищення в головному фільтрі	Очищене повітря	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на тиждень	Е = 99,92 %
Кт 1.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на місяць	Е = 99,9999 %
Кт, Кх 2.1 Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH 6% для інокулятора 30л	Перевірка концентрації, температура, час	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	С = 6 % t =131°С, τ = 60хв Р = 0,15 МПа Відсутність мікробіоти
Кт, Кх 2.2 Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH 6%	Перевірка концентрації, температура, час	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	С = 6 % t =131°С, τ = 60хв Р = 0,15 МПа Відсутність

для ферментера 250л				мікробіоти
Кт, Кх 2.3. Підготовка титрувального агенту HCl	Перевірка концентрації	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	С = 6 %
Кт, Кх 2.4. Підготовка титрувального агенту HCl	Перевірка концентрації	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	С = 6 %
Кх 2.5. Зберігання аміачної води	Перевірка концентрації	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	С = 25 %
Кт 3.1 Депротиїнізація сирної сироватки	Тиск Швидкість фільтрації	Манометр, Витратомір	Під часу процесу ультрафільтрації	р=2 Атм N=150 л/год
Кт, Км 4.1.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 121 °С τ = 15 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С τ = 60 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С τ = 60 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний	t = 121 °С τ = 15 хв Відсутність мікробіоти

			контроль після стерилізації	
Кт, Км 4.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С τ = 60 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 121 °С τ = 15 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С τ = 60 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1 Підтримання колекційної культури	**Колекційна культура *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*** Температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час збереження, мікробіологічний контроль після збереження	t = 4 °С пересів кожні 3 – 4 місяці. відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.2 Одержання робочої культури на агаризованому	Тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування,	t = 37^0С, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти

середовищі			мікробіологічний контроль після культивування	
Кт, Км 5.3 Вирощування культури на агаризованому середовищі	Тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 37^{0}C, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.4 Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безпосередньо під час виробничого процесу.	t = 37^{0}C, τ = 48 год, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 5.5 Вирощування в інокуляторі 30л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, pH - метр мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.	t = 37^{0}C, τ = 48 год, pH-6, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 6.1 Виробниче культивування	Культуральна рідина, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація клітин	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, непрямий метод визначення біомаси, Визначення активності	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу. Відбір проб культуральної рідини − кожні 4 год	t = 37 °C, τ = 48 год, 100 об/хв., pH-6, конц.клітин – 5,1г/л Відсутність сторонньої мікробіоти

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ

9.1 Контроль готової субстанції

СПЕЦИФІКАЦІЯ СУБСТАНЦІЇ

для проведення вихідного контролю якості субстанції (компонента препарату «Лактіалє»)

Найменування показника	**Допустимі межі**	**Методи контролю**	**Примітка**
Ідентифікація	Ліофілізат живих клітин: *Lactobacillus bulgaricus* - палички з заокругленими кінцями, довжина яких коливається від 2 до 9 мікрометрів, товщина - 0,8 мікрометра.	За п.1	Контроль здійснює ВКЯ
Специфічна активність - Кількість життєздатних клітин - Антагоністична активність - Активність кислоутворення	- Сумарно капсула має містити 1,00 x10^8 всіх мікроорганізмів - Ступінь чутливості тест-культур оцінюють за розмірами з он затримки росту, мм : 5-15 - малочутливі ; 15-20 - помірно чутливі ; 20-30 - чутливі; 30-40 – високочутливі. -Показник активності кислотоутворення, має становити не менш як 200	За п.2	Контроль здійснює ВКЯ
Специфічна нешкідливість	Препарат має бути нешкідливим	За п.3	Контроль здійснює ВКЯ
Виробничий штам	*Lactobacillus bulgaricus*	За п.4	Контроль здійснює ВКЯ
Форма випуску	Суха субстанція у пакетиках саше (до подальшого виробництва препарату)	За п.5	-
Умови зберігання	Зберігати у сухому, темному місці, при температурі від 2 до 8 ºС.		

Методи контролю

1. Ідентифікація

Клітини *L. bulgaricus* характеризуються наступними морфологічними ознаками: вони неспороутворюючі, грампозитивні та нерухомі. Їх форма - палички з заокругленими кінцями, довжина яких коливається від 2 до 9 мікрометрів, товщина - 0,8 мікрометра. Клітини розміщені поодинарно і розмножуються поділом перегородкою. На щільних поживних середовищах *L. bulgaricus* утворюють колонії, які переважно мають невеликий розмір - діаметром 2-5 міліметрів. Колонії мають рівний край, вони випуклі, плоскі, блискучі, непрозорі, білого або світло-сірого кольору з темнішим центром. Оскільки для росту потрібні збагачені вітамінами та факторами росту поживні середовища, то на стандартних середовищах типу МПА вони не ростуть [77].

2. Специфічна активність

2.1 Кількість життєздатних клітин

Визначення проводять висівом на чашки Петрі з середовищем MRS методом послідовних десятикратних розведень (метод Коха). Культивування триває 24 год за температури 42°С.

Для аналізу в асептичних умовах відбирають 1 мл приготованої клітинної суспензії і поміщають у 9 мл стерильної водопровідної води або фізіологічного розчину, потім послідовно новою піпеткою переносять по 1 мл у ряд пробірок з 9 мл стерильної водопровідної води. З одержаних (попередньо ретельно перемішаних) розведень здійснюють висів на поверхню агаризованого середовища у чашки Петрі. Висів здійснюють по 0,1 мл, починаючи з найбільшого розведення. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні агаризованого середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Для кожного розведення використовують нову стерильну піпетку і новий стерильний шпатель. Чашки Петрі поміщають у термостат, Культивування триває 24 год за температури 42°С. Після закінчення культивування колонії підраховують [78].

2.2 Антагоністична активність

Антимікробну дію досліджуваних пробіотичних культур визначають кількома методами, наприклад відстроченого антагонізму, різновидом якого є метод агарових блоків. Штами пробіотичних мікроорганізмів засівають «газоном» у товщі агаризованого середовища МРС. Для цього 1 $см^3$ мікробної суспензії переносять у стерильну чашку Петрі, вносять 15-20 $см^3$ розплавленого агаризованого середовища, охолодженого до температури (45±1)°С, ретельно перемішують і залишають чашки на холодній горизонтальній поверхні до затвердіння середовища.

Вирощування здійснюють в анаеробних умовах за температури 37 °С упродовж 72 год , після чого агаровий блок вирізають пробійником та розміщують у центрі чашки Петрі з середовищем Гаузе-2 (або будь-яким іншим, придатним для вирощування досліджуваних патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів) і радіально підсівають тест-культури. Засіяні чашки інкубують за температури 37 °С упродовж 72 год . Ступінь чутливості тест-культур оцінюють за розмірами з он затримки росту, мм : 5-15 - малочутливі ; 15-20 - помірно чутливі; 20-30 - чутливі; 30-40 – високочутливі [79].

2.3 Активність кислоутворення

Активність кислотоутворення препарату визначають титром е тричним методом при вирощуванні біфідобактерій, що містяться у флаконі на модифікованому печінковому середовищі Блаурокка або середовищі Біфідум.

У кожному досліді враховують показники із двох зразків препарату. До біомаси, ліофілізованої у флаконі, додають печінков е се редовище Блаурокка або середовище Біфідум із розрахунку 1 $см^3$ на одну дозу препарату.

Із двох зразків розведеного таким чином препарату переносять по 2,5 см з мікробної зависі в пробірки (d = 2 см , h = 20 см) з 25 $см^3$ печінкового середовища і витримують протягом (72± 1) год за температури (38±1)°С . Після цього визначають кислотність у кожній пробірці.

Отриману суспензію у кількості 10 см з вносять у хімічну склянку місткістю 50 см з і титрують 0,1 М розчином гідроксиду натрію до pH (8,5±0,5). Показник pH контролюють потенціометрична.

Кислотність у градусах Тернера визначають за формулою

$$°T = VK \cdot 10,$$

де V - об'єм 0,1 М гідроксиду натрію, використаний на титрування, мм;

К - коефіцієнт поправки до титру 0,1 М розчину гідроксиду натрію.

Середнє значення активності кислотоутворення, отримане для двох зразків, має бути не нижче ніж 90 °Т.

У разі отримання в одному із зразків показників кислотності нижче ніж 90 °Т дослід повторюють.

Якщо при повторному дослідженні результат незадовільний, то серію препарату бракують [79].

3. Специфічна нешкідливість

Препарат має бути нешкідливим для білих мишей за введення його пероральна в кількості однієї дози.

Випробування проводять на п'яти безпородних мишах різної статі масою 14-16 г (зважують мишей безпосередньо перед дослідом). Вміст флакону розводять водою Р з розрахунку 0,5 $см^3$ на одну дозу препарату. Кожній з п 'яти мишей вводять 0,5 $см^3$ отриманої зависі пероральна в шлунок за допомогою насадки на шприц місткістю 1 $см^3$. Термін спостереження - 5 діб.

Усі тварини мають залишитися живими і не втратити у масі.

У разі загибелі за цей період хоча б однієї тварини або втрати у масі контроль повторюють на подвійній кількості тварин. Препарат вважають нешкідливим, якщо при повторному випробуванні не загинуло жодної з мишей . У протилежному випадку цю серію препарату бракують [79].

Виробничий штам

Lactobacillus delbrueckiisubsp. Bulgaricus PTCC177

9.2. Визначення вологості готової субстанції

Лабораторний аналізатор вологості METRINCO M105MA призначений для точного визначення вологості найрізноманітніших зразків гравіметричним методом [80].

Вимірювання вмісту наважки відбувається у такий спосіб [80]:

- проводиться попереднє зважування зразка
- потім наважку нагрівають за спеціально розробленими методиками, режимами і температурними показниками
- після чого знову зважують й визначають втрату вологи.

При такому аналізі теплового нагрівання зразка можливо також визначати масову частку вільної та зв’язаної води в досліджуваному зразку. Швидкість нагріву і його високі граничні значення (до 199 градусів Цельсія) в аналізаторах вологості METRINCO забезпечуються наявністю галогенного нагрівального елемента.

Висока точність зваження забезпечується ваговим модулем HBM (Німеччина) – 0,005 г дискретності.

Аналізатор вологості METRINCO M105MA має просте й інтуїтивно зрозуміле керування. Можливо задавати програми за параметрами температури і часу.

Прилад має широке застосування в аналітичних лабораторіях, на виробництві, у харчовій галузі тощо.

Рис. 9.1 Лабораторний аналізатор вологості METRINCO M105MA [80]

РОЗДІЛ 10. ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Утилізація відходів на фармацевтичному підприємстві може включати різноманітні методи та підходи для зменшення негативного впливу на навколишнє середовище та ефективного управління відходами. Ось кілька можливих методів утилізації відходів [81]:

1. **Переробка та вторинна утилізація:**
   - Вторинна сировина: Відходи, які мають властивості для використання як вторинна сировина (пластик, скло, картон), можуть піддаватися переробці та використанню в інших виробничих процесах.
   - Компостування: Органічні відходи, такі як рослинні матеріали, можуть бути використані для виробництва компосту.
2. **Зменшення відходів на етапі виробництва:**
   - Ліквідація відходів на джерелі: Впровадження технологічних інновацій та процесів, що зменшують обсяг утворюваних відходів ще на етапі виробництва.
   - Оптимізація використання сировини: Мінімізація відходів шляхом оптимізації використання сировини та ресурсів.
3. **Термічна утилізація:**
   - Згоряння: Деякі види відходів можуть піддаватися термічній утилізації, включаючи згоряння, що дозволяє перетворити відходи в тепло та енергію.
4. **Хімічна утилізація:**
   - Рециклювання хімічних відходів: Використання процесів рециклювання для виділення корисних речовин з хімічних відходів та їх подальше використання.

5. **Утилізація відходів на місці виробництва:**
   - Застосування технологій на місці: Розгляд можливостей для утилізації відходів без їхнього транспортування до інших місць, що може зменшити екологічний вплив.
6. **Енергетична утилізація:**
   - Біогаз та біопаливо: Органічні відходи можуть бути використані для виробництва біогазу або біопалива, що може служити джерелом енергії.

10.1 Очищення стічних вод

«Фармак» у 2021 році інвестував 50 млн гривень у сучасну систему очищення стічних вод на своєму підприємстві у Києві, яка запрацювала цієї восени 2023 року. Навіть у часи війни компанія дотримується своєї стратегії сталого розвитку та відповідального ставлення до екології [82].

Протягом двох років компанія проводила реконструкцію каналізаційних мереж та будівництво сучасної станції фізико-хімічного очищення стічних вод за словацьким технологічним проектом. Щоб не зупиняти критично важливе виробництво ліків, фахівці підприємства прокладали сотні метрів нових мереж паралельно з діючими, а потім зробили складне перемикання фактично «на ходу» [82].

Нові очисні споруди працюють у повністю автоматизованому режимі та забезпечують очищення промислових стічних вод відповідно до встановлених нормативів. Лише після позитивних аналізів за чисельними параметрами, очищені промислові стічні води відводяться в міську каналізацію.

При цьому для очищення виробничих стічних вод експлуатуються локальні очисні споруди, які складаються з усереднювача, нейтралізатора і відстійників, очищені стічні води скидаються в каналізацію Києва. У 2020 році розпочато модернізацію очисних споруд з метою підвищення їх ефективності. Приклад схеми очистки наведено на *рис. 10.1*.

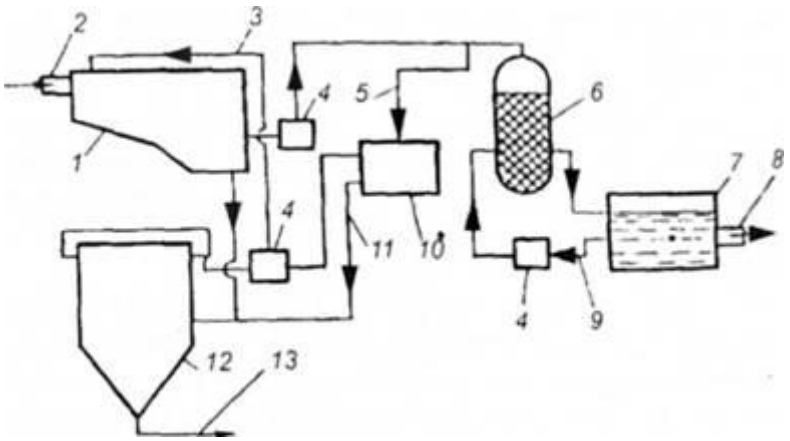

Рис. 10.1. *Схема очищення поверхневих стічних вод з території промислового підприємства* [**83**]**:**

1 — відстійник-усереднювач; 2, 3, 5, 8. 9. 11,13 — трубопроводи; 4 — насос; 6 — фільтр; 7 — ємність; 10 — резервуар; 12 — ущільнювач

Згідно з повідомленням, в 2018-2020 роках компанія пройшла щорічний аудит сертифікованої системи управління навколишнім середовищем по ISO 14001 “Системи екологічного управління. Вимоги та настанови щодо застосовування” [82].

10.1.1 Розрахунок орієнтовного об’єму стічних вод

Залишки мийно-дезінфікуючих засобів. Відомо, що для миття та дезінфекції обладнання за допомогою мобільної циркуляційної CIP-мийки необхідно приготувати робочі розчини із розрахунку 20-30% від об'єму ємкісного обладнання.

Відповідно до специфікації обладнання з курсового проєкту, з ємкісного обладнання маємо: збірник-змішувач 125л, 10л, 100л, 15л, 150л, 50л; інокулятор на 30л для підготовки посівного матеріалу, та ферментер на 250 л. Таким чином, потрібно розрахувати геометричний об'єм ємностей:

$V_{\text{ємностей}}$ = 125+10+100+15+150+50+30+250=730л

Тоді об'єм мийно-дезінфікуючих засобів становитиме:

$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \times 0{,}2 = 730 \times 0{,}2 = 146$ л або

$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \times 0{,}3 = 730 \times 0{,}2 = 219$ л

Приймаємо, що об'єм відпрацьованих залишків засобів дорівнює об'єму цих засобів, тобто 146-219 л.

Відпрацьована вода після ополіскування обладнання. Об'єм води для ополіскування, так само як і мийно-дезінфікуючого розчину, становить 20-30% від об'єму ємнісного обладнання. Як розраховано вище, даний параметр дорівнює 146-219 л.

Таким чином, в сумі орієнтовна кількість стічних вод за один цикл виробництва становитиме: 219 л + 219 л = 262 л.

Орієнтовний об'єм стічних вод на 1 м³ супернатанту. Спочатку потрібно порахувати орієнтовну кількість супернатанту, одержуваного за один виробничий цикл. Відповідно до розрахунків з курсової рооти, за один цикл отримаємо 61 л культуральної рідини з концентрацією абсолютно сухої біомаси 5,1 г/л. Проте, після центрифугування біомаса не буде сухою, її волога складає 70%. У свою чергу, 70% від 5,1 г/л становить 3,57 г/л (вологість біомаси), тоді концентрація вологої біомаси дорівнює 18 г/л. Тоді у 61 л культуральної рідини вміст вологої біомаси становить 218 г. Так як основою культуральної рідини є вода, то 61000 г – 218 г = 60782 г супернатанту, або 60,782 л (61 л).

Таким чином, за один виробничий цикл отримуємо 61 л супернатанту та 262 л стічних вод. Тоді на 1 м² супернатанту припадає 1874 л (1,9 м³) стічних вод

10.1.2 Середні витрати стічних вод підприємства

Відповідно до ТЕО, річний об`єм культуральної рідини дорівнює 20 м^3/рік. Приймаємо кількість робочих трудоднів ($Т_{рд}$) 330, тоді кількість культуральної рідини (КР) за цикл становить: 61л/доба.

Середні за зміну витрати виробничих стічних вод, м^3/добу, визначають за формулою:

$$\boldsymbol{Q}_{\text{в}} = \boldsymbol{q}_{\text{е}} \times \boldsymbol{n}$$

де *qe* - норма водовідведення в м^3 на одиницю продукції, яку випускає підприємство (розраховано вище 1,9 м^3); *n* – кількість одиниць продукції, що виробляється за зміну (розраховується у масових одиницях випуску готової продукції на добу)

$$Q_{\text{в}} = 1{,}9 \text{ x } 20 = 38 \text{ (м}^3\text{/доба)}$$

Середні за зміну витрати побутових стічних вод:

$$\boldsymbol{Q_n = q_n^{\times} N}$$

де q_n - норма відведення побутових стічних вод в м^3/зм на одного робітника, яку приймають для гарячих цехів 0,045 м^3/(зм люд), для холодних - 0,025 м^3/(зм люд); N - кількість робітників, що працюють в зміну. Для перерахунку даного показника на добу необхідно помножити на кількість змін на добу та на 24 і поділити на тривалість однієї зміни.

Q_n = 0,025 м^3/(зм люд) х 8 людей = 0,2 м^3/зм

Перерахунок даного показника на добу:

(0,2 ×3×24)/8 = 1,8 м³/добу,

де 3 - кількість змін на добу;

24 - кількість годин у добі;

8 - тривалість однієї зміни, год.

Загальна витрата атмосферних стічних вод, що утворюються на підприємстві (Q_a). Орієнтовно можна прийняти у об'ємах у 5-30 разів меншому за витрати побутових стічних вод:

$$Q_a = Q_{\text{п}}/5=0,2/5 = 0,04 \text{ (м}^3\text{/добу)}.$$

Загальні витрати стічних вод, що утворюються на підприємстві (Q):

$Q=Q_{\text{в}} + Q_{\text{п}} + Q_{\text{а}}$ *= 38+1,8+0,04 = 39,84 м³/добу.*

10.2. Очищення повітря

Багатоступеневому очищенню підлягає і повітря системи вентиляції очисних споруд. Тим самим повністю нейтралізуються шкідливі речовини та неприємний запах. Компанія “Фармак” (Київ) в 2020 році скоротила викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря на 33,05% в порівнянні з 2019 роком [84].

“У 2020 році суттєво зменшилися викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря, в загальному на 33,05%, зокрема по котельні – на 14,89% (враховуючі CO2) або на 50,67% (без врахування CO2) в порівнянні з 2019 роком завдяки експлуатації нових котлів Vitomax компанії Viessmann та відносно теплий осінньо-зимовий період, що дало змогу зекономити споживання

природного газу на 13,45% порівняно з минулим роком", – йдеться в повідомленні [84].

Згідно з повідомленням, у "Фармак" для очищення наявних шкідливих домішок, присутніх у повітрі, яке відводиться від промислового обладнання при виробництві твердих лікарських засобів (Цех № 4), експлуатуються 6 газоочисних установок (очисних споруд).

"Для уловлення речовин у вигляді суспендованих твердих частинок (пил лікарських засобів), використовуються сучасні установки очищення аспіраційного повітря, які обладнанні циклонами, або фільтрами тонкої очистки. Також для очищення повітря були придбані і змонтовані центральні вакумні системи (ЦВС). Забруднене повітря, в яких, проходить 4-х ступеневу очистку (циклон-сепаратор пилу-фільтр тонкої очистки –вугільний фільтр). Ефективність роботи газоочисних установок при оптимальному режимі роботи становить до 99,5%" [84]. На *рис. 3.2* наведена схема роботи циклону [85].

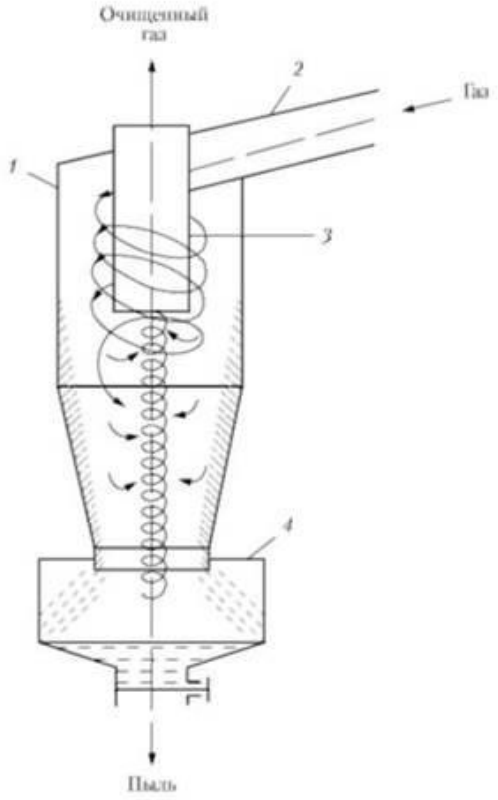

Рис. 10.2 Схема роботи циклону

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА:

1. Застосування пробіотиків для профілактики та лікування інфекційних захворювань *[Електронний ресурс] //Режим доступу:* https://d-l.com.ua/ua/archive/2011/4%2811%29/pages-62-72/zastosuvannya-probiotikiv-dlya-profilaktiki-ta-likuvannya-infekciynih-zahvoryuvan

2. Paz, David, et al. "Probiotic Characteristics of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus as Influenced by Carao (Cassia grandis)." *Fermentation* 8.10 (2022): 499. doi.org/10.3390/fermentation8100499

3. ПСИХОБІОТИКИ ПРОТИ ДЕПРЕСІЇ. ЯК МІКРОБІОМ ВПЛИВАЄ НА ПОВЕДІНКУ? *[Електронний ресурс] //Режим доступу:* https://laktiale.ua/vse-pro-probiotiki/shho-take-probiotiki/psihobiotiki-proti-depresiji-yak-mikrobiom-vplivae-na-povedinku/

4. ПСИХОБІОТИКИ – НОВИЙ ВИД ПРОБІОТИКІВ *[Електронний ресурс] //Режим доступу:* https://laktiale.ua/vse-pro-probiotiki/shho-take-probiotiki/psihobiotiki-noviy-vid-probiotikiv/

5. Paz, David, et al. "Probiotic Characteristics of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus as Influenced by Carao (Cassia grandis)." *Fermentation* 8.10 (2022): 499. doi.org/10.3390/fermentation8100499

6. Ashraf, Rabia, and Nagendra P. Shah. "Selective and differential enumerations of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei and Bifidobacterium spp. in yoghurt—A review." *International journal of food microbiology* 149.3 (2011): 194-208. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.008

7. Jan, G., Tarnaud, F., do Carmo, F. L. R., Illikoud, N., Canon, F., Jardin, J., ... & Gagnaire, V. (2022). The stressing life of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus in soy milk. *Food Microbiology*, *106*, 104042. doi.org/10.1016/j.fm.2022.104042

8. Oyeniran, A., Gyawali, R., Aljaloud, S. O., Krastanov, A., & Ibrahim, S. A. (2020). Probiotic characteristics and health benefits of the yogurt bacterium

Lactobacillus delbrueckii sp. bulgaricus. In *Current issues and challenges in the dairy industry*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.86939

9. Лактіалє капсули по 230 мг №30 *[Електронний ресурс] //Режим доступу: https://laktiale.ua/laktiale-kapsuli/*

10. Інструкція з використання "Лактіалє® " Дієтична добавка капсули *[Електронний ресурс] //Режим доступу: https://laktiale.ua/storage/origin/products/10/7fd47b4c0a59964041b441cc95aa85a9.pdf*

11. Лактіалє (капсули) *[Електронний ресурс] //Режим доступу: https://farmak.ua/drugs/laktiale-kapsouli/*

12. Rezvani, F., Ardestani, F., & Najafpour, G. (2017). Growth kinetic models of five species of Lactobacilli and lactose consumption in batch submerged culture. *brazilian journal of microbiology*, *48*, 251-258. doi.org/10.1016/j.bjm.2016.12.007

13. Rezvani F., Ardestani F., Najafpour G. Growth kinetic models of five species of *Lactobacilli* and lactose consumption in batch submerged culture. *J.Brazil. Micrrobiol*. 2017. doi: 10.1016/j.bjm.2016.12.007

14. de Freitas, R. M., Carvalho, J. D. G., Bruno, L. M., & Pinto, G. A. S. Production of Lactobacillus rhamnosus BRM 029693 in feed-batch fermentation. Research, Society and Development, 9(7), 2020. e531974280-e531974280. DOI: https://doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4280

15. Hwang, C. F., Lin, C. K., Yan, S. Y., Chang, R. H., & Tsen, H. Y. Enhancement of biomass production and nutrition utilization by strain Lactobacillus acidophilus DGK derived from serial subculturing in an aerobic environment. African Journal of Biotechnology, 14(3), 248-256. 2015. DOI: 10.5897/AJB2013.12839

16. Практична мікробіологія: навч. посіб. / С. І. Климнюк, І. О. Ситник, В. П. Щиробоков та ін.; за заг. ред. В. П. Широбокова, С. І. Климнюка. Вінниця: Нова Книга, 2018. 576 с.

17. Санітарна мікробіологія: підруч. / С. П. Гудзь, С. О. Гнатуш, Г. І. Звір. Львів: ЛНУ ім. І. Франка, 2016. 348 с.

18. Chen X. et al. Probiotics improve eating disorders in mandarin fish (Siniperca chuatsi) induced by a pellet feed diet via stimulating immunity and regulating gut microbiota. Microorganisms. 2021;9(6):1288

19. POT, Bruno; TSAKALIDOU, Effie. Taxonomy and metabolism of Lactobacillus. *Lactobacillus molecular biology: From genomics to probiotics*, 2009, 1: 1-56.

20. ЩО ПОРУШУЄ МІКРОФЛОРУ КИШЕЧНИКА *[Електронний ресурс]* // Режим доступу: https://zafacol.com.ua/shcho-porushue-mikrofloru-kyshechnika/

21. ДИСБАКТЕРІОЗ КИШЕЧНИКА *[Електронний ресурс]* // Режим доступу: https://diameb.com/korusni-statti/dysbakteri

22. Як налагодити роботу кишківника? *[Електронний ресурс]* // Режим доступу: https://www.amway.ua/article/health/how-to-improve-bowel-function

23. Що таке дисбактеріоз насправді: причини виникнення, симптоми та ефективні препарати для лікування *[Електронний ресурс]* // Режим доступу: https://www.apteka24.ua/uk/blog/zdorove-semi/chto-takoe-disbakterioz-na-samom-dele-prichiny-vozniknoveniya-simptomy-i-ehffektivnye-preparaty-dlya-lecheniya/

24. Лактіалє капсули по 230 мг №30 *[Електронний ресурс]* // Режим доступу: https://laktiale.ua/laktiale-kapsuli/#product-content-1

25. Степанов, Ю. М., І. Ю. Скирда, and О. П. Петішко. "Хвороби органів травлення—актуальна проблема клінічної медицини." *Гастроентерологія* 53,№ 1. 2019: 1-6. *[Електронний ресурс] // Режим доступу:*http://repo.dma.dp.ua/4798/1/163450-364077-1-PB.pdf

26. Rezvani F., Ardestani F., Najafpour G. Growth kinetic models of five species of *Lactobacilli* and lactose consumption in batch submerged culture. *J.Brazil. Micrrobiol*. 2017. doi: 10.1016/j.bjm.2016.12.007

27. Chervaux C, Ehrlich SD, Maguin E. Physiological study of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* strains in a novel chemically defined medium. *Appl Environ Microbiol*. 2000, 66(12):5306-5311. doi: 10.1128/AEM.66.12.5306-5311.2000.

28. Galactose metabolism - *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ND02. *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?lde00052

29. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ND02. [Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://www.genome.jp/pathway/lde00010

30. Пирог, Т.П. Загальна мікробіологія: підручник, 2-е вид., доп. і перероб. / Т.П. Пирог. – К. :НУХТ, 2010. – 632 с.

31. Пирог, Т.П. Біохімічні основи мікробного синтезу: підручник / Т.П. Пирог, Ю.М. Пенчук. – К. :Ліра-К, 2019. – 258 с

32. Glycerophospholipid metabolism - *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ND02. [Електронний ресурс] // Режим доступу*: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?lde00564

33. Biosynthesis of amino acids - *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ND02 [Електронний ресурс] // Режим доступу*: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?lde01230

34. Purine metabolism - *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ND02 *[Електронний ресурс] // Режим доступу*: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?lde00230

35. Pyrimidine metabolism - *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ND02- [Електронний ресурс] // Режим доступу*: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?lde00240

36. Патент України на винахід № 64160. Штам lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus imb b-7055 для виготовлення біологічно активних добавок і біологічно активна добавка “лактокоректин” / Бубало О.Ф., Ємець С.Р. Опубл. 16.02.2004. *[Електронний ресурс] //Режим доступу: file:///C:/Users/ASRock/Downloads/64160-uapatents.com.pdf*

37. Конструкції ферментерів *[Електронний ресурс] //Режим доступу: https://bioengineering.kpi.ua/attachments/article/277/%D0%93%D0%BB%D0%B0%D0%B2%D0%B0%204.pdf*

38. Rezvani F., Ardestani F., Najafpour G. Growth kinetic models of five species of *Lactobacilli* and lactose consumption in batch submerged culture. *J.Brazil. Micrrobiol*. 2017. doi: 10.1016/j.bjm.2016.12.007

39. Лебединець, В. О. "Підготовка персоналу підприємства з виробництва лікарських засобів при впровадженні та в умовах функціонування системи управління якістю." *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації* 1 (2014): 28-35. *[Електронний ресурс] //Режим доступу:* https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/5279/1/%D0%A1%D1%82%D1%80%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D1%86%D1%8B%20%D0%B8%D0%B7%20UEC_1_2014-5.pdf

40. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництвЕлектронний ресурс: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.

41. Сертифікація ISO 22000:2018 *[Електронний ресурс] //Режим доступу:* https://www.sgs.com/ru-ua/services/iso-22000-2018-certification

42. Класифікація виробничих приміщень виробництва нестерильних лікарських засобів *[Електронний ресурс] //Режим доступу:* https://studfile.net/preview/7443252/page:42/

43. Сода каустична *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://prom.ua/ua/p1649369789-soda-kausticheskaya-5kg.html?&primelead=My42

44. Біомой *[Електронний ресурс] // Режим доступу: https://prom.ua/ua/p1377979018-biomoj.html*

45. Дезекон *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://prom.ua/ua/p1537967088-dezekon-flakon-dozator.html

46. Хлорантоїн *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://prom.ua/ua/p276027906-hlorantoin.html

47. Патент України на винахід № 64160. Штам lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus imb b-7055 для виготовлення біологічно активних добавок і біологічно активна добавка “лактокоректин” / Бубало О.Ф., Ємець С.Р. Опубл. 16.02.2004. *[Електронний ресурс] //Режим доступу: file:///C:/Users/ASRock/Downloads/64160-uapatents.com.pdf*

48. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньопрофесійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О.П. , Гуляєв В.М. – Кам′янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с. *[Електронний ресурс] //Режим доступу: https://www.dstu.dp.ua/Portal/Data/5/8/5-8-kl1.pdf*

49. Очищення та стерилізація повітря *[Електронний ресурс] //Режим доступу: https://studopedia.com.ua/1_387431_zagalna-harakteristika-tovarnogo-rinku.html*

50. Концентрування та висушування біопрепаратів *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* http://moyaosvita.com.ua/biologija/koncentruvannya-ta-visushuvannya-biopreparativ//

51. Вольська, О. Г., Шинкаренко, Л. М., Тодосійчук, Т. С., Зарицька, І. С., & Заболотна, Д. Д. (2006). Вибір наповнювачів для готових лікарських форм препаратів на основі селекціонованих штамів лактобацил. *Одеський медичний журнал*, (5), 3-6. *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* file:///C:/Users/volod/Downloads/Omj_2006_5_2.pdf

52. Малежик І.Ф., Процеси і апарати харчових виробництв: підручник. – К.: НУХТ, 2003. – 400 с.

53. Плоскі пакети саше *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://pakado.kiev.ua/ua/g9909582-ploskie-pakety-sashe

54. Повітрозбірники горизонтальні та вертикальні типу А1І серії 5.903-20 і 5.903-2 *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://prom.ua/ua/p3866044-vozduhosborniki-gorizontalnye-vertikalnye.html?&primelead=NC4z

55. Фільтруючий матеріал G4 від NEW FILTER *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/filtruyuchiy-material-g4.html

56. Поршневий компресор ВКП F АВ 515-10-200 *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://kompressor.kiev.ua/katalog/porshnevye-kompressory/vkp-f-seriya-industrial76/kompressor-vkp-f-ab-515-10-200.html

57. ТЕПЛООБМЕННИКИ ДЛЯ КОТЛОВ, ВЕНТИЛЯЦИИ, КОНДИЦИОНИРОВАНИЯ *[Електронний ресурс] // Режим доступу:*

https://termoprom.com.ua/teploobmenniki/po-naznacheniyu/teploobmenniki-dlya-kotlov-ventilyacii-kondicionirovaniya

58. Ресивер 500 літрів 15 бар CE *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://tehno-parts.com.ua/resiver-500-litrov-15-bar-ce?gclid=CjwKCAiA0syqBhBxEiwAeNx9N8vD3lTvB7k9cYUF2yCoQU77dgXZOc65lDqIWbX1SN5xsZlomnsAlxoCezwQAvD_BwE

59. Система підігріву повітря *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php

60. Кишенькові фільтри F5 для вентиляції від NEW FILTER *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/kishenkovi-filtri-f5-dlya-ventilyatsiyi.html

61. Промислова система ультрафільтрації Ecosoft UF-30 *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://aqua-filter.net.ua/filtry-dlya-vody/promyshlennaya-sistema-ultrafiltratsii-ecosoft-uf-30

62. Насос Grundfos UPS *[Електронний ресурс] //Режим доступу:* https://modernsys.com.ua/tsirkulyatsionnyy-nasos-grundfos-ups-25-60-130-19121.html

63. Хімічний реактор 125 л. з мішалкою, сорочкою, механізмом нахилу, гомогенізатором, механізмом підйому кришки *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://prom.ua/ua/p1720154888-himicheskij-reaktor-125.html

64. Ємності, змішувачі, реактори з нержавіючої сталі під замовлення *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://prom.ua/ua/p1115370771-emkosti-smesiteli-reaktory.html?&primelead=MC44NQ

65. Реактор мобільний 100л AISI 304 *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://prom.ua/ua/p1254660370-reaktor-mobilnyj-100l.html?&primelead=MC44NQ

66. ЛАБОРАТОРНИЙ РЕАКТОР 15 Л *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://khimmix.ua/ua/himicheskie-reaktory/laboratornyj-reaktor-15-l

67. Реактор-змішувач номінальним об'ємом 150 л. Сталь AISI 316L *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://promvit.com.ua/reaktor-smesitel-nominalnym-obemom-150-l-stal-aisi-316l/

68. Реактор для рідини РС-50 (Виконання ЕХ) *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-zhidkosti-rs-50-ispolnenie-ex/

69. Ферментер | Біореактор із нержавіючої сталі для вашої лабораторії *[Електронний ресурс] // Режим доступу:* http://www.sartorius-sd.com.ua/index.php/%D1%81%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D1%83%D0%B5%D0%BC%D1%8B%D0%B5-%D0%BD%D0%B0-%D0%BC%D0%B5%D1%81%D1%82%D0%B5-%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80%D1%8B/biostat%C2%AE-cplus.html

70. Стерилізуючі фільтри для газів *[Електронний ресурс] //Режим доступу:* http://novafilter.tech/products/f%D1%96ltri/steril%D1%96zuyushh%D1%96/dlya-gaz%D1%96v

71. Біореактори з нержавіючої сталі, що виготовляються на замовлення. *[Електронний ресурс] //Режим доступу:* http://www.sartorius-sd.com.ua/index.php/%D1%81%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D1%83%D0%B5%D0%BC%D1%8B%D0%B5-%D0%BD%D0%B0-%D0%BC%D0%B5%D1%81%D1%82%D0%B5-%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80%D1%8B/%D0%B8%D0%B7%D0%B3%D0%BE%D1%82%D0%B0%D0%B2%D0%BB%D0%B8%D0%B2%D0%B0%D0%B5%D0%BC%D1%8B%D0%B5-%D0%BF%D0%BE%D0%B4-%D0%B7%D0%B0%D0%BA%D0%B0%D0%B7-%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80%D1%8B-%D0%B8%D0%B7-%D0%BD%D0%B5%D1%80%D0%B6%D0%B0%D0%B2%D0%B5%D1%8E%D1%89%D0%B5%D0%B9-%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BB%D0%B8.html

72. Мікробіологія галузі. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051701 "Харчові технології та інженерія" професійного спрямування «Технології зберігання, консервування та переробки плодів і овочів» ден. та заоч. форм навчання / Уклад.: С.М. Тетеріна, Н.М.Грегірчак, В.О.Красінько. – К.: НУХТ, 2013. – 48 с.

73. Красінько В.О. Основи екобіотехнології: Конспект лекцій для студ. Напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2011. – 143 с.

74. Грегірчак Н.М. Мікробіологія харчових виробництв: Лаборатор. Практикум. – К.: НУХТ, 2009. – 302 с.

75. Визначення концентрації органічного азоту методом Несслера *[Електронний ресурс] //Режим доступу: https://studfile.net/preview/12538458/page:5/*

76. "Ферментний кондуктометричний біосенсор для визначення лактози." 2009. *[Електронний ресурс] //Режим доступу:* https://cyberleninka.ru/article/n/fermentnyy-konduktometricheskiy-biosensor-dlya-opredeleniya-laktozy/viewer

77. Meghwal, Murlidhar, Megh R. Goyal, and Rupesh S. Chavan, eds. *Dairy engineering: Advanced technologies and their applications*. CRC Press, 2017.

78. Основи генетичної та клітинної інженерії. Ч. І. Генетичне конструювання in vivo: метод. вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / Уклад. : І.Р. Клечак, Т.С. Тодосійчук, В.М. Ліновицька, Л.О. Тітова. – Київ : КПІ імені Ігоря Сікорського, 2017. – 50 с.

79. Технологія пробіотиків: Підруч. І С . О. Старовойтова, О.І. Сн:роцька. Ю.М . Пенчук, Т.П . Пирог. - К.: НУХТ, 2012. - 318 с. ISBN 978-966-612-127-4

80. Лабораторний аналізатор вологості METRINCO M105MA *[Електронний ресурс] //Режим доступу:* https://simvolt.ua/laboratorniy-analzator-vologost-metrinco-m105ma.html/

81. Екологічні проблеми зберігання та утилізації відходів в Україні *[Електронний ресурс] //Режим доступу: https://wiki.legalaid.gov.ua/index.php/%D0%95%D0%BA%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%87%D0%BD%D1%96_%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B1%D0%BB%D0%B5%D0%BC%D0%B8_%D0%B7%D0%B1%D0%B5%D1%80%D1%96%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8F_%D1%82%D0%B0_%D1%83%D1%82%D0%B8%D0%BB%D1%96%D0%B7%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%97_%D0%B2%D1%96%D0%B4%D1%85%D0%BE%D0%B4%D1%96%D0%B2_%D0%B2_%D0%A3%D0%BA%D1%80%D0%B0%D1%97%D0%BD%D1%96*

82. Турбота про екологію Києва: «Фармак» під час війни інвестував у нову систему очищення стічних вод *[Електронний ресурс] //Режим доступу:* https://farmak.ua/steels/proekti/

83. Очищення стічних вод *[Електронний ресурс] //Режим доступу:* https://pidru4niki.com/1640011641667/ekologiya/ochischennya_stichnih_vod_mashinobudivnih_pidpriyemstv

84. “Фармак” скоротив викиди в атмосферу на 33,1% в 2020 році *[Електронний ресурс] //Режим доступу:* https://farmak.ua/steels/proekti/

85. Циклон *[Електронний ресурс] // Режим доступу*: https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A6%D0%B8%D0%BA%D0%BB%D0%BE%D0%BD_(%D1%82%D0%B5%D1%85%D0%BD%D1%96%D0%BA%D0%B0)