

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»
Декан факультету
_____ **Наталія ГРЕГІРЧАК**
(підпис) (ім'я та прізвище)

« » червня 2024 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
_____ **Віктор СТАБНИКОВ**
(підпис) (ім'я та прізвище)

« » 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 *Bacillus clausii* як основи пробіотику
Ентерожерміна»

Виконала: здобувачка IV курсу, групи II

БОРОВА Марія Олександрівна
(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

Здобувачка _____
(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 СТАБНИКОВ

“ 01 ” березня 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧКИ

БОРОВОЇ Марії Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Одержання біомаси *Bacillus clausii* як основи пробіотики
Ентерожерміна»

керівник роботи СТАРОВОЙТОВА Світлана Олександрівна,
(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 2 стадії підготовки посівного матеріалу в колбах на качалці
та в інокуляторі об'ємом 10л, біосинтез цільового продукту у ферментері об'ємом
100л, коефіцієнт заповнення 0,6. Тривалість культивування 34 год., температура 35
°С. Культивування припиняють за досягнення в культуральній рідині біомаси 8,3 г/л.
Річна потреба у препараті 15,55 кг за 210 трудоднів.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ;
Розділ 1. Характеристика цільового продукту; Розділ 2. Обґрунтування вибору та
характеристика біологічного агенту; Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування;
Розділ 4. Біосинтез цільового продукту; Розділ 5. Обґрунтування вибору
технологічної схеми; Розділ 6. Специфікація обладнання; Розділ 7. Опис
технологічної схеми; Розділ 8. Контроль виробництва; Розділ 9. Обґрунтування стадій
виділення та очищення спор *Bacillus clausii*; Розділ 10. Охорона
довкілля.

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема 1 лист А1; Технологічна схема 1 лист А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.03.24 – 10.03.2024	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	11.03.2024 – 19.03.2024	
3	Техніко-економічне обґрунтування	20.03.2024 – 25.03.2024	
4	Біосинтез цільового продукту	26.03.2024 – 02.04.2024	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	03.04.2024 – 10.04.2024	
6	Специфікація обладнання	11.04.2024 – 17.04.2024	
7	Опис технологічної схеми	18.04.2024 – 30.04.2024	
8	Контроль виробництва	01.05.2024 – 15.05.2024	
9	Обґрунтування стадій виділення та очищення спор <i>Bacillus clausii</i>	16.05.2024 – 25.05.2024	
10	Охорона довкілля	26.05.2024 - 28.05.2024	

Здобувач

(підпис)

Марія БОРОВА

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Світлана СТАРОВОЙТОВА

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено розробленню біотехнології одержання біомаси *Bacillus clausii* як основи Ентерожерміна - пробіотичного препарату, що приймають з метою відновлення нормальної мікрофлори кишківника. Даний пробіотик застосовують для лікування дисбіозу як у дорослих, так і у дітей. В медичній практиці застосовується для посилення бар'єрної функції кишківника при лікуванні антибіотиками та сприяє синтезу вітамінів в організмі людини.

В ході виконання кваліфікаційної роботи проведено техніко-економічне обґрунтування і визначено, що розрахована потужність виробництва для забезпечення 111 080 осіб становить 15,55 кг біомаси *Bacillus clausii*, що дорівнює 1 555 120 капсул зі спорами у складі на рік для задовільнення потреб 5% цільової групи населення (діти віком від 5 до 9 років).

Новизною роботи є використання продуцента з найвищими показниками отримання біомаси (8,3 г/л), порівняно з іншими розглянутими біологічними агентами. Технологічний процес біосинтезу *Bacillus clausii* включає в собі допоміжні роботи (підготовка дезінфікуючих розчинів, аераційного повітря, приготування 6% розчину соляної кислоти, приготування та стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію, стерилізація піногасника, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (дві стадії підготовки посівного матеріалу в колбах на качалці та інокуляторі об'ємом 10 л і біосинтез цільового продукту в ферментері об'ємом 0,1 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6). Технологія отримання біомаси передбачає використання трьохстадійної схеми культивування біологічного агенту глибинним періодичним способом у рідкому середовищі при перемішуванні та аерації.

Кваліфікаційна робота викладена на 123 сторінках друкованого тексту, містить 18 таблиць. Складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (100 джерел) та графічної частини (2 креслення формату А1).

Ключові слова: *Bacillus clausii*, біосинтез, біомаса, Ентерожерміна, пробіотик, культивування.

ABSTRACT

Qualification work is dedicated to the development of biotechnology for obtaining *Bacillus clausii* biomass as the base component of Enterogermina, a probiotic used to restore normal intestinal microflora. This probiotic is used to treat dysbiosis in both adults and children. In medical practice, it is applied to enhance the barrier function of the intestines during antibiotic treatment and to promote the synthesis of vitamins in the human body.

During the qualification work, a feasibility study was conducted and it was determined that the calculated production capacity to supply 111,080 individuals is 15.55 kg of *Bacillus clausii* biomass, which equals 1,555,120 capsules containing spores per year to meet the needs of 5% of the target population group (children aged 5 to 9 years).

The novelty of the work lies in the use of a biological agent with the highest biomass yield (8.3 g/L) compared to other biological agents considered. The technological process of *Bacillus clausii* biosynthesis includes auxiliary tasks (preparation of disinfectant solutions, air for aeration, preparation and sterilization of 6% HCl solution, preparation and sterilization of 6% sodium hydroxide solution, sterilization of antifoam agent, preparation and sterilization of nutrient medium) and the technological process (two stages of inoculum preparation in flasks on a shaker and in a 10 L inoculator, and biosynthesis of the target product in a 0.1 m³ fermenter with a fermenter filling ratio - 0.6). The biomass production technology involves using a three-stage cultivation scheme of the biological agent using batch fermentation in a liquid medium with mixing and aeration.

Qualification work is presented on 123 pages of printed text, contains 18 tables, and consists of an introduction, ten chapters, a list of references (100 sources), and a graphic part (2 A1 format drawings).

Key words: *Bacillus clausii*, biosynthesis, biomass, Enterogermina, probiotic, cultivation.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	10
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	13
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	13
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для вирощування <i>Bacillus clausii</i> – продуцента Ентерожерміна.....	18
2.3. Морфолого-культуральні ознаки біологічного агента.....	20
2.4. Фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	22
2.5. Таксономічний статус біологічного агента	24
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	26
3.1. Потреба у цільовому продукті	26
3.2. Розрахунок річної потреби.....	29
3.3. Розрахунок потужності виробництва пробіотику Ентерожерміна	31
3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 100 л.....	32
3.4.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 10 л.....	33
3.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для отримання інокуляту в колбах на качалці	34
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	35
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	35
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	36
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва	42
5.1 Вибір типу ферментера.....	42
5.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.	44
5.3. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів	45
5.3.1. Розрахунок потреб у дезінфікувальних засобах	49
5.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища ...	51
5.4.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках	52
5.4.2 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокулятор об'ємом 10 л	53
5.4.3 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту у ферментері об'ємом 100 л.....	54

5.5. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника	55
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....	58
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	60
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва.....	74
8.1. Карта постадійного контролю	74
8.2. Методики мікробіологічного контролю	78
8.2.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ.....	78
8.2.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури.....	79
8.3. Показники росту цільового продукту	80
8.3.1. Визначення концентрації біомаси	80
8.3.2. Метод визначення життєздатних клітин	80
8.3.3. Метод визначення кількості спор.....	81
8.3.4. Специфічна нешкідливість.....	82
8.3.5. Антагоністична активність	82
8.3.6. Визначення стійкості пробіотичної культури до антибіотиків.....	83
8.4. Концентрація джерела вуглецю та азоту	83
8.4.1. Визначення концентрації джерела вуглецевого живлення	83
8.4.2. Визначення концентрації джерела азотного живлення	84
РОЗДІЛ 9. Обґрунтування стадій виділення та очищення спор <i>Bacillus clausii</i>	86
9.1. Виділення клітин з культуральної рідини	86
9.2. Отримання спорової суспензії	89
9.3. Концентрування розчину спор.....	91
9.4. Висушування суспензії спор	92
9.5. Формування готового препарату	96
9.6. Матеріальні потоки та підбір обладнання	98
РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля	102
10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	102
10.2. Системи знешкодження рідких відходів	102
10.2.1. Визначення середніх витрати стічних вод від виробничого підприємства.	103
10.3. Системи знешкодження газоподібних відходів.....	105
10.4. Системи знешкодження твердих відходів	107
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:	108
ДОДАТКИ.....	119

ВСТУП

Дисбактеріоз – це зміна структури мікробіому, що впливає на склад та його функції призводить до захворювань, що можуть бути викликані великою кількістю факторів. При дисбактеріозі потенційно патогенні мікроорганізми домінують у кишківнику над потенційно корисними [1]. Тому необхідним є відновлення мікробіоти кишківника до здорового та збалансованого стану за допомогою пробіотиків, пребіотиків та синбіотиків [2]. Важливою метою біотехнологічного виробництва є забезпечення максимально сприятливих умов для росту культури, збільшення виходу цільового продукту. Це досягається шляхом підтримання заданої температури, ретельно підібраного складу поживного середовища, рівня рН, аерації та перемішування при культивуванні біологічного агенту. Головна мета біосинтезу заснована на методах та засобах виконання виробничих процесів, що дозволяють отримати продукти з вихідного матеріалу шляхом хімічних реакцій та в процесі обміну речовин. Для отримання найбільш економічно вигідних результатів встановлюють склад поживних середовищ та умов культивування.

Бактерії роду *Bacillus* є досить добре вивченими у якості продуцентів біологічно-активних речовин, що є представниками транзиторної мікрофлори кишківника та за своїми властивостями використовуються у якості компонентів лікарських засобів пробіотичної дії. Пробіотичні бактерії широко застосовуються в якості антимікробних препаратів, що вибірково діють на патогенні мікроорганізми без суттєвих порушень мікрофлори шлунково-кишкового тракту, що може відбуватись при застосуванні антибіотиків широкого спектру дії [3].

Як пробіотик штами *Bacillus clausii* почали використовувати у складі препарату Ентерожерміна з 1960-х років в Італії та згодом лікарський засіб став застосовуватись у всьому світі для лікування проти діареї та побічних ефектів, що пов'язані з дією антибіотиків [4]. Молекулярний аналіз історичних і комерційних зразків препарату Ентерожерміна показав, що штами, які входять у склад пробіотику (O/C, N/R, T і SIN) демонструють низький рівень внутрішньовидового геномного різноманіття, що

					НУХТ 04.02.24. КР ПЗ										
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата	Вступ				Літера		Аркуш		Аркушів		
Розроб.	Борова М.О.											8		123	
Перевір.	Старовойтова С.О.														
Консульт.															
Н. контр.															
Зав.кафедр.	Стабніков В.П.														
									Кафедра БТМ						
									8						

вказує на те, що за останні 25 років відбувались незначні зміни в штаммах у складі препарату. При аналізі послідовності геному, отриманого з чотирьох штамів *B. clausii*, виявлено здатність до синтезу бактеріоцинів, підвищену стресостійкість до навколишніх умов, що у комплексі сприяють виживанню *B. clausii* у жорстоких умовах шлунково-кишкового тракту [5]. Штами *Bacillus clausii* використовувались у ряді досліджень, що визначають їх корисні фізіологічні властивості, такі як стійкість до тепла, кислоти, солей жовчі, здатності до посилення бар'єрної функції кишечника, синтез вітамінів, зокрема рибофлавіну (В₂) та стійкість до дії антибіотиків, що є важливими властивостями для клінічної практики [6,7].

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

Ентерожерміна – пробіотик, у складі якого міститься 4 полірезистентних штамів *Bacillus clausii* (O/C, N/R, SIN і T, стійких до хлорамфеніколу, новобіоцину/рифампіцину, неоміцину/стрептоміцину та тетрацикліну відповідно), що зазвичай присутні у кишечнику та не виявляють патогенної активності. Як пробіотик штами *Bacillus clausii* почали використовувати у складі препарату Ентерожерміна з 1960-х років в Італії та згодом лікарський засіб стали використовувати у всьому світі для лікування діареї та побічних ефектів, що пов'язані з дією антибіотиків. Геном штаму *Bacillus clausii* було таксономічно ідентифіковано в Інституті Л. Пастера в 2005 році у Франції [4].

Виробником пробіотику є фірма «Sanofi-Aventis», Італія. Препарат випускають у двох лікарських формах: суспензія та капсули. Суспензія Ентерожерміна, 1 флакон по 5 мл у своєму складі містить спори полірезистентного штаму *Bacillus clausii* - 2×10^9 та очищену воду у якості допоміжної речовини; суспензія Ентерожерміна Форте - 1 флакон по 5 мл з концентрацією спор 4×10^9 ; тверді капсули Ентерожерміна з концентрацією спор 2×10^9 у одній капсулі та допоміжні речовини (каолін, целюлоза мікрокристалічна, магній стеарат). За фізико-хімічними властивостями суспензія являє собою напівпрозору (опалесцентну) рідину з білуватим кольором, яка може мати характерний запах. Капсули тверді желатинові білого кольору, усередині містять порошок білуватого кольору [8].

Дія препарату направлена на відновлення нормальної мікрофлори кишечника, що може бути змінена та пошкоджена у результаті прийому антибіотиків. Пробіотик призначають пацієнтам для лікування дисбактеріозу кишечника та ендогенного дисвітаміноза, що може виникати на його основі. Суспензії використовують з метою лікування гострих та хронічних шлунково-кишкових захворювань, що пов'язані з інтоксикацією та дисвітамінозом у немовлят, яких годують грудним молоком, покращення травлення, імуномодуючих властивостей. Пробіотик знайшов широке застосування як у дорослих так і у дітей раннього віку (від 28-го дня життя).

					НУХТ 04.02.24. КР ПЗ							
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата								
Розроб.		Борова М.О.			Розділ 1. Характеристика цільового продукту				Літера	Аркуш	Аркушів	
Перевір.		Старовойтова С.О.									10	123
Консульт.									10			
Н. контр.									Кафедра БТМ			
Зав.кафедр.		Стадніков В.П.										

До механізмів завдяки яких бактерії роду *Bacillus* пригнічують ріст патогенних мікроорганізмів у шлунково-кишковому тракті відносять:

- колонізація вільних екологічних ніш, що стають недоступними для росту інших мікроорганізмів, в особливості спор у початковій та проміжній фазах гермінації (перебування мікроорганізму в своїй вегетативній вірулентній формі);
- синтез антибіотиків і ферментів, що секретуються у кишківник;
- конкуренція за адгезію до епітелію кишківника, що має значення для фаз росту спор [4].

За фармакотерапевтичною групою відноситься до антидіарейних мікробних препаратів. Мікроорганізм здатен рости при температурі від 30 до 50°C і концентрацією NaCl до 10%. У моделі *in vitro*, що імітує середовище шлунку, спори *Bacillus clausii* тестували за здатністю виживати та розмножуватись. Визначено, що за рівню рН 1,4-1,5 коефіцієнт виживання спор становить 96% до 120 хвилин. Розмноження в умовах шлункового середовища (сольовий розчин жовчі та панкреатину з рівнем рН 8) становило від 10^9 до 10^{12} колонієутворювальних одиниць (КУО) з 240 хвилин після інкубації. Важливою таксономічною характеристикою виду є здатність рости у лужних умовах. Досліджено, що штами *Bacillus clausii* стійкі до лужних умов середовища з невеликою відмінністю. Прискорене зменшення тривалості лаг-фази при рН 7 демонстрували штами O/C і SIN на відміну від N/R і T. В той же час скорочення часу генерації спостерігали у всіх штамів при зміні умов від нейтральних до лужних. Пробіотичні спори здатні витримувати зміну рН до 2, вегетативні клітини – рН 6 та проявляти лабільність при $\text{pH} \leq 4$. Культивування у середовищі з додаванням нітрату показало, що штами *Bacillus clausii* здатні до росту у мікроаерофільних умовах, що є значною перевагою для адаптації в умовах шлунково-кишкового тракту [9]. Наведена фармакодинаміка вказує на те, що спори у складі пробіотику Ентерожерміна можуть бути використані у медичній практиці з метою досягнення антигенного та антитоксичного ефекту в організмі.

Пробіотик використовують для продукування антибактеріальної речовини щодо *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, патогенних штамів *Enterococcus faecium*, рота- й аденовірусів. Штамам властива стійкість до ряду антибіотиків: пеніциліни, цефалоспорини, тетрацикліни, макроліди, аміноглікозиди (за винятком

гентаміцину і амікацину), рифампіцин, налідиксова та пипемідова кислоти та інші [6]. Це вказує на те, що препарат можна приймати водночас з антибактеріальними препаратами наведених груп. Штам О/С *B. clausii* продукує лантибіотик клаузин, за яким виявлено антимікробну активність проти деяких грампозитивних бактерій і пригнічення цитотоксичної дії *Staphylococcus aureus* та *Clostridioides difficile*, не проявляє активності до грамнегативних бактерій, грибів. Визначено, що клаузин О/С діє на ліпідні проміжні продукти синтезу бактеріального пептидоглікану [11]. При культивуванні в сироватці вегетативні клітини *Bacillus clausii* продукують антимікробні пептиди, що пригнічують ріст таких мікроорганізмів як *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* і *Enterococcus faecalis*. Виявлено здатність SIN і Т штамів *B. clausii*, що входять до складу пробіотику Ентерожерміна, синтезувати велику кількість вітаміну В2 – 20 нг. Активний синтез вітамінів дозволяє організму людини поповнити запаси вітамінних речовин, надходження яких може бути недостатньо лише їжею [10]. Пробіотична дія препарату також зумовлена вираженою ферментативною активністю бактерій *Bacillus*. Потрапляння у шлунок амілази та ліпази призводить до нормалізації процесів травлення, особливо при дисбактеріозі, субтилізин та каталаза активізують ріст *Lactobacillus* [11]. Експериментальними та клінічними даними визначено, що *Bacillus clausii* підвищує ефективність ерадикації (повне винищення) *Helicobacter pylori* у слизовій оболонці шлунку. При терапії з додатковим використанням Ентерожерміна визначено більш низьку рівність розвитку рвоти, діареї, нудоти у пацієнтів [12].

Лікування пробіотиками, до складу яких входять штами *B. clausii*, показало підвищення виробництва муцину, синтезу білків. Вони сприяють захисному ефекту та стимулюванню слизового бар'єру шлунку при лікуванні ротавірусної інфекції та зменшення симптомів та побічної дії при лікуванні інфекції, пов'язаної з *Helicobacter pylori* [10].

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента

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

До складу препарату Ентерожерміна входять спори *Bacillus clausii*. Спори використовують в складі пробіотиків через їх антимікробну та імуномодуляторну дію. В моделях *in vivo* штами проявляють здатність до підвищення вироблення інтерферону, проліферацію Т-клітин та вироблення лімфокінів. При аналізі послідовності геному, отриманого з чотирьох штамів *B. clausii* O/C, N/R, T і SIN, виявлено продукування бактеріоцинів Bac-GM17 та лантибіотику клаузин, підвищену стресостійкість до навколишніх умов, що у комплексі сприяє виживанню *B. clausii* у жорстоких умовах шлунково-кишкового тракту [5]. Штами *Bacillus clausii* використовувались у ряді досліджень, що визначають їх корисні фізіологічні властивості, такі як стійкість до підвищеної температури, кислоти, солей жовчі, здатності до посилення бар'єрної функції кишечника, синтез вітамінів, зокрема рибофлавіну (B₂) та стійкість до дії антибіотиків, що є важливими властивостями для клінічної практики [6,7]. Пробіотики у складі яких є штами *Bacillus clausii* використовують для лікування гострого гастроентериту для зменшення тривалості та тяжкості діареї у дітей [12].

Лікування пробіотиками, до складу яких входять штами *B. clausii*, показало підвищення виробництва муцину, синтезу білків. Вони сприяють захисному ефекту та стимулюванню слизового бар'єру шлунку при лікуванні ротавірусної інфекції та зменшення симптомів та побічної дії при лікуванні інфекції, пов'язаної з *Helicobacter pylori* [14]. Позитивний вплив *B. clausii* на організм вказує на важливість пошуку найефективніших продуцентів, процесу культивування та отримання біомаси для високих концентрацій пробіотичних лікарських засобів для захисту мікрофлори людини та тварин.

Під час аналізу літератури було визначено, що більшість представлених пробіотиків у своєму складі містять бактеріальні штами роду *Bacillus*, тому було

					НУХТ 04.02.24. КР ПЗ										
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата											
Розроб.		Борова М.О.			Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента				Літера		Аркуш		Аркушів		
Перевір.		Старовойтова С.О.										13		123	
Консульт.									Кафедра БТМ						
Н. контр.															
Зав.кафедр.		Стадніков В.П.													
					13										

проаналізовано здатність до утворення біомаси деякими штамами (*табл. 2.1*), а саме *Bacillus clausii* (8,3 г/л) [13], *Bacillus clausii* PP 473-8 (4,6 г/л) [15] та *Bacillus subtilis* ATCC 6051 (1,6 г/л) [16]. Склад поживних середовищ та умови культивування даних штамів відрізняються між собою. Згідно даних наведених у *табл.2.2* визначено, що середовища для культивування мікроорганізмів мають наближену вартість, але отримана концентрація біомаси *Bacillus clausii* у 1,8 та 5 разів більша ніж у *Bacillus clausii* PP 473-8 та *Bacillus subtilis* ATCC 6051 відповідно. Також перевагою досліджуваного штаму є здатність до синтезу лужної протеази, що має такі додаткові пробіотичні властивості, як катаболізм білка в організмі людини. Протеази знаходяться у шлунковому соці та активуються у дванадцятипалій кишці, вони здатні до розщеплення білків до амінокислот, що є додатковою пробіотичною властивістю для покращення роботи шлунково-кишкового тракту після антагоністичної дії антибіотиків [17].

Для остаточного вибору найефективнішого біологічного агенту було проведено розрахунок умовної вартості 1 г цільового продукту (*табл. 2.3*). Визначено, що умовна вартість 1 г цільового біомаси у *B. clausii* є найнижчою (2,07 грн/г).

Особливості одержання біомаси на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація біомаси г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Bacillus clausii</i> PP 473-8	Глюкоза Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ · 7H ₂ O (NH ₄) ₂ SO ₄ CaCl ₂ · 2H ₂ O Розчин мікроелементів Розчин вітамінів: Тіамін хлорид Рибофавін Нікотинова кислота Кальцій пантоненат Піридоксин-HCl Біотин Фолієва кислота	4,4 4,2 4,2 3 3 0,14 0,2 0,2 2,28 0,19 1,53 1,9 0,38 0,075 0,19	69	4,6	(pH = 7,55; t°=35°C; n=1500 об/хв)	Christiansen T., Michaelsen S., Wümpelmann M., Nielsen J. Production of savinase and population viability of <i>Bacillus clausii</i> during high-cell-density fed-batch cultivations. <i>Biotechnology and Bioengineering</i> . 2003, 83(3): 344–352. doi:10.1002/bit.10675
<i>Bacillus clausii</i>	Глюкоза KNO ₃ дріжджовий екстракт K ₂ HPO ₄ Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ MgSO ₄ · 7H ₂ O CaCl ₂ Na ₂ CO ₃ Розчин солей: Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ FeSO ₄ · 7H ₂ O CuSO ₄ · 5H ₂ O ZnCl ₂	10 5,8 7 4 4 0,5 0,002 10 1% або 10 г/л 10 0,1 2 0,2 0,2	34	8,3	Культивування у ферментері об'ємом 3 л з робочим об'ємом 2 л (t°=35°C; n=400–900 об/хв; pH=10; аерація 0,6 атм)	Tabandeh F., Hosseinian Moghaddam H. R., Yakhchali B., Shariati P., Hamed Mousavian M. T., Ghasemi F. Fed-batch fermentation of <i>Bacillus clausii</i> for efficient production of alkaline protease using different feeding strategies. <i>Chemical Engineering Communications</i> . 2011, 198(9): 1063–1074. doi:10.1080/00986445.2011.552024

Закінчення табл. 2.1

<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	Глюкоза	2,5	72	1,6	Культивування у колбах Ерленмеєра об'ємом 250 мл з 50 мл середовища (t° = 30°C; n = 200 об/хв)	Neves C.R.S.S, Penna T.C.V. Benzene Biodegradation by <i>Bacillus Subtilis</i> in Water and Validation System with Kefir Grains as Biological Indicator. <i>J. Biology, Agriculture and Health science</i> . 2015, 4(3): 96-101.
	дріжджовий екстракт	2				
	казеїн	17				
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2				
	Фермент папаї	3				
	NaHCO ₃	5				
	K ₂ HPO ₄	2,5				
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2				
	CaCl ₂	0,02				
	KH ₂ PO ₄	1				
	NH ₄ NO ₃	1				
	FeCl ₃	0,03				

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів пробіотика

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації *
1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus clausii</i> PP 473-8	Глюкоза	4,4	42	0,19	1
	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	4,2	125	0,53	2
	K ₂ HPO ₄	4,2	223	0,94	3
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	3	16	0,05	4
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3	19,80	0,06	5
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,14	39	0,0055	6
	Тіамін хлорид	2,28	1848	4,2	7
	Рибофлавін	0,19	858	0,163	8
	Нікотинова кислота	1,53	249	0,381	9
	Кальцій пантотенат	1,9	1400	2,66	10
	Піридоксин-HCl	0,38	1600	0,61	11
	Біотин	0,075	1800	0,14	12
	Фолієва кислота	0,19	1800	0,34	13
	Вартість 1 л середовища – 10,27 грн				
<i>Bacillus clausii</i>	Глюкоза	10	42	0,42	1
	KNO ₃	5,8	79,20	0,46	14
	дріжджовий екстракт	7	1800	12,6	15
	K ₂ HPO ₄	4	223	0,89	3
	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	4	159	0,64	16
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5	20	0,01	4
	CaCl ₂	0,002	39	0,00008	6
	Na ₂ CO ₃	10	30,90	0,3	17
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,1	2040	0,204	18
	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	10	159	1,59	16
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,2	68	0,014	19
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	2	28,80	0,06	20
	ZnCl ₂	0,2	100,80	0,02	21
	Вартість 1 л середовища – 17,21 грн				
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	Глюкоза	2,5	42	0,11	1
	дріжджовий екстракт	2	1800	3,6	15
	казеїн	17	600	10,2	22
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2	16	0,003	4
	Фермент папаї	3	2063	6,19	23
	NaHCO ₃	5	18	0,09	24
	K ₂ HPO ₄	2,5	223	0,56	3
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2	20	0,004	4
	CaCl ₂	0,02	39	0,0008	6
	KH ₂ PO ₄	1	134	0,13	25
	NH ₄ NO ₃	1	21,90	0,022	26
	FeCl ₃	0,03	168	0,005	27
	Вартість 1 л середовища - 20,92 грн				

Примітка. * - Ціни наведено станом на травень 2024 р.

1 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-glyukoza>, 2 - <https://flagma.ua/fosfornokisly-natriy-2-zameshchenny-bv-pishch-o14568889.html>, 3 - <https://flagma.ua/pirofosfat-kaliyu-kaliy-fosfornokisly-piro-chotirizamishcheniy-o13622923.html>, 4 - <https://flagma.ua/magniy-sulfat-sulfat-magniya-kristally-7-o4501403.html>, 5 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-amonij-sirchanokyslyj-sulfat-amoniyu>, 6 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-kaltsij-hlorystyj-hloryd-kaltsiyu>, 7 - <https://flagma.ua/vitamin-b1-tiamin-o13538864.html>, 8 - <https://flagma.ua/riboflavin-farm-500257-merck-1-kg-o13159028.html>, 9 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-nikotynova-kyslota>, 10 - <https://flagma.ua/kalciy-pantotenat-d-farm-o13134879.html>, 11 - <https://flagma.ua/vitamin-v6-kormovoy-o4926904.html>, 12 - <https://flagma.ua/biotin-kormovoy-vitamin-v7-o4148549.html>, 13 - <https://flagma.ua/foleivaya-kislota-vitamin-v9-o10300596.html>, 14 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-kalijna-selitra-kalij-azotnokyslyj-nitrat-kaliyu>, 15 - <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>, 16 - <https://flagma.ua/tsytrat-natriu-natrii-lymonnokyslyi-trokhzamishcheniy-o9466995.html>, 17 - <https://flagma.ua/karbonat-natriya-soda-kalcinirovannaya-natriy-uglekisly-o9368207.html>, 18 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-amonij-molibdenovokyslyj-molibdat-amoniyu>, 19 - <https://flagma.ua/medny-kuporos-o2216450.html>, 20 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-zalizo-sirchanokysle-7-vodne>, 21 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-tsnyk-hlorystyj-hloryd-tsnyku>, 22 - <https://prom.ua/p234403806-mitsellyarnyj-kazein-proteina.html>, 23 - <https://flagma.ua/papain-1-kg-o4484905.html>, 24 - <https://flagma.ua/natriy-uglekisly-kisly-o14568913.html>, 25 - <https://flagma.ua/kaliy-monofosfat-mkf-mkr-o4510745.html>, 26 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-amiachna-selitra-azotnokyslyj-amonij-nitrat-amoniyu>, 27 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-zalizo-iii-hlorne>.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г/л біомаси, отриманої на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація біомаси за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus clausii</i> PP 473-8	4,6	69	0,07	10,27	2,23
<i>Bacillus clausii</i>	8,3	34	0,24	17,21	2,07
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	1,6	72	0,02	20,92	13,08

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для вирощування *Bacillus clausii* – продуцента Ентерожерміна

Поживні середовища повинні містити всі елементи, з яких складається клітина, причому в такій формі, в якій мікроорганізми здатні їх засвоювати. Від концентрації основних компонентів поживного середовища залежить накопичення біомаси. Відомо, що до складу бактеріальної клітини входять такі елементи (% до маси сухої речовини): Карбон – 50; Оксиген – 20; Нітроген – 10...14; Гідроген – 8; Фосфор – 3; Сульфур, Калій, Натрій - 1; Кальцій, Магній, Хлор – 0,5; Ферум – 0,2; решта елементів – близько 0,3.

Тривалість культивування *Bacillus clausii* становила 34 год і максимальна отримана концентрація біомаси становила 8,3 г/л [13].

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься 50% Вуглецю, отже вміст Вуглецю в 8,3 г/л біомаси становить $8,3 \times 0,5 = 4,2$ г. Ця кількість Карбону міститься у $(4,2 \times 180) / 72 = 10,5$ г вуглеводів. Враховуючи 40% витрат субстрату на «холосте окиснення», для одержання 8,3 г/л біомаси, необхідно внести $(4,2 \times 0,4) + 4,2 = 5,9$ г/л глюкози.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси. Припустимо, що у біомасі міститься 10% Нітрогену. Звідси у 8,3 г/л біомаси вміст азоту (за елементом N) вміст азоту становить 0,83 г. Як джерело мінерального Нітрогену у середовищі культивування використовували нітрат калію - KNO_3 .

Розрахуємо кількість нітрату калію, потрібного для одержання 8,3 г/л біомаси. Молекулярна маса KNO_3 становить 101,1. Отже у 101 г нітрату калію міститься 14 г Нітрогену, звідси у 0,83 г Нітрогену буде міститись $(101 \times 0,83) / 14 = 5,9$ г солі.

Розрахунок вмісту Фосфору у середовищі

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься приблизно 3% Фосфору. Отже, для синтезу 8,3 г/л біомаси вміст Фосфору у середовищі повинен становити $8,3 \times 0,03 = 0,25$ г/л. Молекулярна маса дигідрофосфату калію K_2HPO_4 становить 136, отже, у 136 г дигідрофосфату калію міститься 31 г Фосфору, тоді 0,25 г Фосфору буде міститись у $(136 \times 0,25) / 31 = 1,1$ г солі.

Розрахунок вмісту Кальцію у середовищі

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься 0,5% Кальцію, звідси у 8,3 г/л біомаси вміст Кальцію в середовищі становить $8,3 \times 0,005 = 0,042$ г. Як джерело мінерального Кальцію у середовищі культивування використовують хлорид кальцію - CaCl_2 .

Кількість хлориду кальцію, потрібного для одержання 8,3 г/л біомаси. Молекулярна маса становить 111. Отже у 111 г хлориду калію міститься 40 г Кальцію, звідси у 0,042 г Кальцію буде міститись $(111 \times 0,042) / 40 = 0,12$ г.

Розрахунок вмісту Калію у середовищі

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься 1% Калію, звідси у 8,3 г/л біомаси вміст Калію становить $8,3 \times 0,01 = 0,083$ г. Як джерело мінерального Калію у середовищі культивування використовують дифосфат калію – K_2HPO_4 .

Молекулярна маса дигідрофосфату калію становить 136, отже у 136 г K_2HPO_4 міститься 78 г Калію, тоді 0,083 г Калію буде міститись у $(136 \times 0,083) / 78 = 0,15$ г.

Інші компоненти середовища

Джерелами необхідних для росту мікроорганізму елементів, як Сульфур, Магній, Натрій, Хлор, Ферум є солі цитрату натрію ($Na_3C_6H_5O_7$), сульфату магнію ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), хлориду кальцію ($CaCl_2$), калію нітрату (KNO_3), що не здатні пригнічувати ріст *Bacillus clausii*, оскільки такі компоненти вносять у середовище культивування у надлишку.

Згідно з розрахунками визначено, що для культивування *Bacillus clausii* компонентів обраного поживного середовища було взято у надлишку. Скоригований після проведення перевірного розрахунку склад поживного середовища для виробничого культивування *Bacillus clausii* наведено у табл.2.4. Оскільки продуцент продукує протеази, на синтез яких будуть витрачатись компоненти середовища для культивування, склад поживного середовища буде використовуватись, як наведено у статті [13].

Таблиця 2.4

Скоригований склад поживного середовища для отримання біомаси *Bacillus clausii*

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л
Глюкоза	5,9
KNO_3	5,9
K_2HPO_4	1,2
$CaCl_2$	0,12

2.3. Морфолого-культуральні ознаки біологічного агенту

Бактерії роду *Bacillus* є одними з найпоширеніших у природі мікроорганізмами. Являють собою грампозитивну рухому аеробну непатогенну паличку з закругленими краями, що формує спори. Клітини спокою знаходяться

усередині бактеріальної клітини не викликаючи модифікацій звичайної форми бактерій. Під мікроскопом сукупність бактеріальних клітин розташовуються разом та формують довгі ланцюги (рис. 2.1.). У клітини наявна товста клітинна стінка, що складається з пептогліканового муреїну. Розміри бактеріальної клітини складають: довжина 2-3 мікрметра, ширина 1 мікрметр [3].

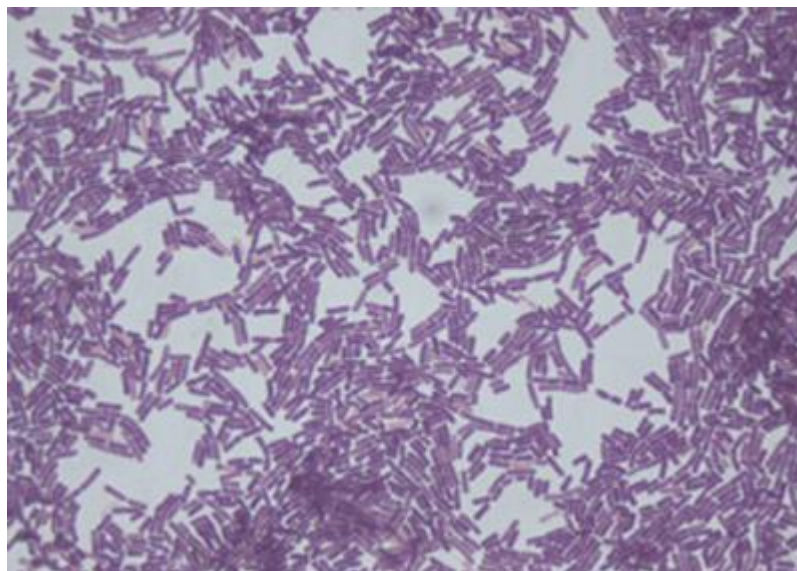


Рис 2.1. *Bacillus clausii*: форма клітин зафарбованих за Грамом під світловим мікроскопом, збільшення $\times 90$ [3]

В культурах агару утворюють круглі біло-жовті матові колонії з нерівними краями, що мають діаметр близько 3-4 мм. Мають правильну форму, плоский рельєф, ущільнені в центрі, сухі і не проростають в агар (рис. 2.2.).

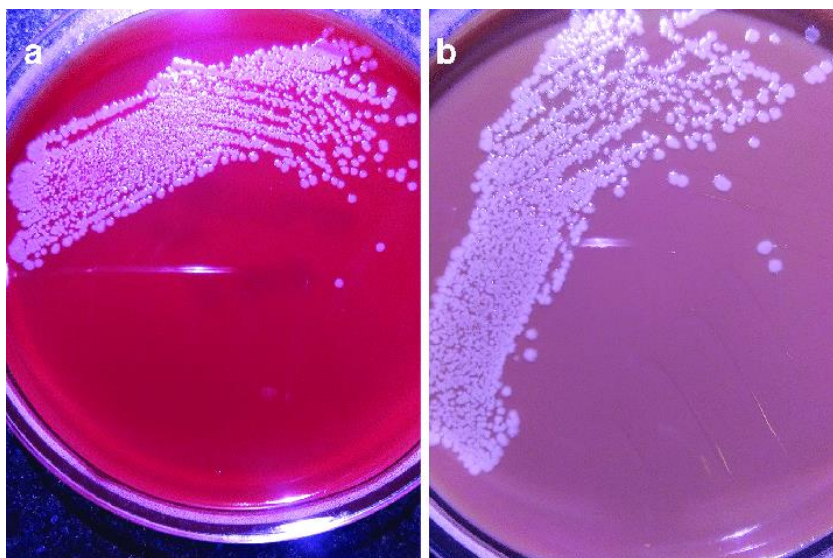


Рис 2.2. Зовнішній вигляд культур *Bacillus clausii* на поживних середовищах:
а – кров'яний агар; б – шоколадний агар [12]

Мікроорганізми *Bacillus clausii* головним чином можуть бути знайдені у ґрунті, також їх виділяють з води, повітря та харчових продуктів, таких як злакові культури, соєві боби, мука та молочна мікрофлора. Бактерії наявні у шлунково-кишковому тракті та дихальних шляхах здорової людини, а також постійно проникають в організм через повітря, питну воду та їжу [18]. Встановлено, що *Bacillus clausii* виробляє антимікробні речовини, що проявляють активність проти грампозитивних бактерій, включаючи *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* та *Clostridium difficile*. Лужнофільна природа мікроорганізму вказує на те, що він несе користь при лікуванні та профілактиці різноманітних шлунково-кишкових розладів у якості преоральної бактеріотерапії [19, 10].

2.4. Фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агенту

Оптимальний рівень рН для росту бактерій *Bacillus clausii* складає 7,0 – 9,0, зміна до рН = 5,7 – 6,0 знижує ріст та розмноження мікроорганізмів. Ці значення вказують на те, що бактерія є алкалофільною. Доведено властивість спор до часткової адаптації до виживання в агресивному середовищі шлунку напротязі 120 хвилин при рН 2-7. В той же час, вегетативні форми *B. clausii* не здатні існувати при рН = 2 більше ніж 10 хвилин, при рН = 3 – 60 хвилин [20]. Найбільш сприятливі умови для розвитку пробіотичних штамів *B. clausii* є рН = 8. Спори виявляють здатність рости у температурних межах від 20°C до 45°C на рідких поживних середовищах та температура культивування зростає на твердих поживних середовищах досягаючи 50°C. Оптимальними температурними межами вважають 35-40°C в той час як при 55°C ріст припиняється. Це вказує на те, що *Bacillus clausii* являє собою мезофільний мікроорганізм. Спори стійкі до дії солей, можуть рости за наявності NaCl до 10% [21]. Здатні до гідролізу казеїну, желатину, крохмалю та здійснюють редукцію нітрату в той же час не проявляють здатності до дезамінування фенілаланіну [22].

Стійкість до антибіотиків є позитивною ознакою безпеки пробіотика. Вона надає можливість використовувати пробіотичні препарати одночасно з лікуванням антибіотиками і захищати кишківник, що було подразнено і позбавлено природної мікрофлори, та доповнювати корисними бактеріями [23]. Вегетативні клітини

штамів *Bacillus clausii* O/C, N/R, SIN і T різною мірою стійкі до різних антибіотиків. Повна стійкість визначається до дії таких антибіотиків як еритроміцин, азитроміцин, спіраміцин, лінкоміцин, кларитроміцин та метронідазол [11]. Резистентність до дії антибіотичних препаратів може змінюватись в залежності від штаму бактерії. Так штам N/R *Bacillus clausii* містить хромосомно кодований ген β -лактамази, який проявляє стійкість до дії пеніцилінів [24]. В хромосомах містяться гени, що забезпечують стійкість до макролідів, аміноглікозидів. Ген стійкості до хлорамфеніколу присутній у *B. clausii* як копія хромосоми і не може бути переданий іншим мікроорганізмам, що свідчить про те, що гени стійкості до антибіотиків обмежуються цим видом [25].

Аналіз геному *Bacillales* показав, що мікроорганізми даного ряду є багатим джерелом протимікробних препаратів, що включають у себе три класи бактеріоцинів. Бактерії, що належать до роду *Bacillus*, продукують широкий спектр антимікробних речовин, у тому числі лантибіотики, які є посттрансляційно модифікованими пептидами [26]. Запобігання росту патогенних бактерій у шлунково-кишковому тракті відбувається за допомогою виробництва протимікробних препаратів, таких як лантибіотик клаузин, продукцію якого виявлено зокрема у двох штамів *Bacillus clausii* — UBBC07 та O/C [28]. Клаузин, що отримують з *B. clausii* UBBC07 проявляє антимікробну активність проти деяких грампозитивних бактерій [28]. Штам O/C *B. clausii* продукує клаузин, за яким також виявлено антимікробну активність проти деяких грампозитивних бактерій і пригнічення цитотоксичної дії *Staphylococcus aureus* та *Clostridioides difficile* [11]. Також визначено, що клаузин O/C діє на ліпідні проміжні продукти синтезу бактеріального пептидоглікану. При культивуванні в сироватці вегетативні клітини *Bacillus clausii* продукують антимікробні пептиди, що пригнічують ріст таких мікроорганізмів як *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* і *Enterococcus faecalis* (рис. 2.3.). Також досліджено здатність виробляти пептиди та пригнічувати ріст шляхом ферментації препарату *Bacillus clausii* Sinuberase з кавовою гущею, що вказує на здатність штаму виділяти антимікробні пептиди в середовище культивування [27].

Виявлено здатність SIN і Т штамів *B. clausii*, що входять до складу пробіотика «Ентерожерміна», синтезувати велику кількість вітаміну В₂ – 20 нг. Активний синтез вітамінів дозволяє організму людини поповнити запаси вітамінних речовин, надходження яких може бути недостатньо лише їжею [11].

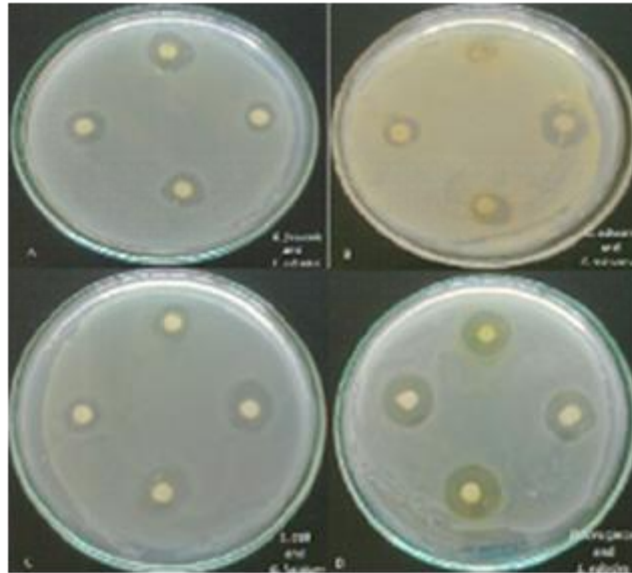


Рис 2.3. Дослідження антибактеріальної активності проти патогенних бактерій (*Enteropathogenic Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*)

Виявлено, що бактерії *Bacillus clausii* здатні запобігати проявам ентеропатогенних інфекцій у тварин. Лікування спорами штамів *B. clausii* O/C, N/R, SIN і Т показали зменшення ураження, кількості кишкових залишків та збільшення кількості епітеліальних залозистих клітин слизових оболонок, що виділяють слиз. Внаслідок цього більш неушкоджена слизова оболонка та підвищений рівень муцину (основний компонент секретів слизових залоз, що складається з глікопротеїдів) чинять захисну та імуномодулюючу дію на селезінку та мезентеріальні лімфатичні вузли [28, 29].

2.5. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для бактерій *Bacillus clausii* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [30].

Домен – *Bacteria*

Відділ - *Firmicutes*

Клас – *Bacilli*

Порядок - *Bacillales*

Родина – *Bacillaceae*

Рід - *Bacillus*

Вид - *clausii*

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1. Потреба у цільовому продукті

Техніко-економічне обґрунтування присвячено аналізу потреб в пробіотику після культивування *Bacillus clausii* з метою одержання пробіотика Ентерожерміна у ферментері об'ємом 100 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 для лікування та профілактики дисбактеріозу і гострих кишкових інфекцій дітей.

Актуальність використання пробіотиків

Проблематиці дисбактеріозу на даний час приділяється багато уваги як медиками, так і науковцями. За даними вітчизняної та світової статистики, із даною проблемою постійно стикається 80-90% людей різних вікових та соціальних груп. Світовий ринок фармацевтичних препаратів для лікування дисбіотичних порушень на сьогодні складає понад 90 млрд у.о. і постійно зростає. Тим не менше, універсального та однозначно дієвого вирішення даної проблеми не знайдено [31].

Явище дисбактеріозу - це насамперед порушення мікробіоценозу травного тракту. За останні роки суттєво розширилися уявлення про склад та значення мікрофлори кишечника людини. Були встановлені основні етапи формування мікробіоти травного тракту людини, досліджено її якісний та кількісний склад у людей різних вікових категорій, імунного статусу, з різними індивідуальними фізіологічними особливостями. У процесі еволюційного розвитку людини сформувалася мікроекологічна система з притаманною їй складною динамічною рівновагою між фізіологічним статусом та мікробними популяціями, що заселяють його біотопи. У той самий час, ця рівновага доволі часто може порушуватися внаслідок ряду причин, що призводять до розвитку так званого дисбіотичного стану.

При надмірній колонізації нехарактерними для організму мікроорганізмами у людей будь-якого віку може спостерігатися дисбіоз інфекційного походження.

НУХТ 04.02.24. КР ПЗ

					НУХТ 04.02.24. КР ПЗ						
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування	Літера		Аркуш		Аркушів	
Розроб.		Борова М.О.						26	123		
Перевір.		Старовойтова С.О.				26					
Консульт.						Кафедра БТМ					
Н. контр.											
Зав.кафедр.		Стабніков В.П.									

Інфекційні агенти можуть бути різними, характеризуватися більшим чи меншим ступенем вірулентності і патогенності, а також бувають ендогенного (є компонентом нормобіоти і активізуються на фоні супутніх факторів) та екзогенного походження (збудник проникає в організм ззовні). Часто збудниками кишкових інфекцій є сальмонели, шигели, стафілококи, клебсієли, протей, ентеропатогенні штами кишкової палички, тощо.

Окреме місце в етіології дисбіотичних порушень відводиться дисбіозам, пов'язаним із захворюваннями шлунково-кишкового тракту (ШКТ) та операційними втручаннями. Практично будь-яке захворювання ШКТ може призвести до значних змін у складі мікрофлори, при чому часто явище дисбактеріозу виходить на перший план, приховуючи першопричину. Негативно на стан мікрофлори впливають такі розлади як, порушення секреції травних ферментів, зниження бар'єрної функції соляної та жовчних кислот. Також було показано, що часто із дисбіозами асоційовані такі хвороби як виразкова хвороба шлунку та дванадцятипалої кишки, гастрит (особливо - гіпосекреторний), захворювання жовчного міхура та жовчевивідних шляхів, печінки, хронічний панкреатит, запальні процеси кишківника. Причиною дисбіозу можуть стати також різні анатомо-фізіологічні порушення ШКТ та вроджені ферментопатії (наприклад, синдром мальабсорбції, хвороба Гіршпрунга, хвороба Крона, видалення апендиксу).

Окрім харчування, на виникнення стану дисбактеріозу можуть впливати й інші фактори: різка зміна клімато-географічних умов, надмірні фізичні і нервово-емоційні навантаження. Експериментально було показано зростання кількості кишкової палички, клостридій та протей при зниженій руховій активності [31].

Пріоритетною метою стратегічного плану В 128/24, схваленого ВООЗ, є зменшення медико-санітарного, соціального та економічного тягаря інфекційних хвороб. Така увага до інфекційних захворювань не є випадковою, оскільки саме вони, зокрема – гострі кишкові інфекції (ГКІ), є найбільш частою причиною дитячої смертності [32].

В Україні захворюваність на ротавірусну інфекцію (РІ) становить до 3,18 на 100 тис. населення, однак реальний показник значно вищий через обмеження вірусологічної діагностики [32]. Ротавіруси є збудниками від 35 до 73% від усіх ГКІ. Для спалахів РІ у дітей раннього віку характерні тяжкі прояви. Головну небезпеку становить швидке зневоднення організму (ексикоз) через блювання й діарею. Особливо тяжко переносять зневоднення діти молодшого віку, в яких на цьому тлі можуть виникати судоми, порушення роботи серцево-судинної системи, гостра ниркова недостатність. За відсутності адекватного лікування стан може дуже швидко погіршуватися аж до летального кінця.

На сьогодні немає специфічної терапії РІ. Як і при інших діарейних захворюваннях, основою лікування є відновлення втрати рідини, запобігання водно-електролітним порушенням і введення препаратів, які зменшують тяжкість перебігу та тривалість хвороби.

Оскільки основою патогенезу діареї при РІ є пошкодження вірусами кишкової мікробіоти, слід забезпечити ентеропротекторну спрямованість терапії, що допоможе відновити втрачені функції мікробіоти. Це допоможе стимулювати гуморальну й клітинну ланки імунітету, забезпечити захист слизової оболонки - цитопротекцію і підвищити резистентність епітеліальних клітин, пригнічити ріст шкідливих мікроорганізмів, забезпечити захоплення й виведення вірусів, призведе до відновлення гомеостазу приепітеліальної зони. Одним із основних підходів до відновлення функцій кишкової мікрофлори є використання пробіотиків – живих мікроорганізмів, що при введенні в організм у помірних кількостях проявляють корисну дію для здоров'я людини, нормалізують склад і функції мікрофлори шлунково-кишкового тракту [32].

Пробіотичний препарат Ентерожерміна містить чотири полірезистентних штами грампозитивної аеробної ендоспороутворювальної бактерії *Bacillus clausii*, яким притаманний широкий спектр антибактеріальної резистентності. *B. clausii* характеризується унікальною здатністю спорових і вегетативних форм до розмноження, виживання та функціонально-метаболічної активності в шлунково-кишковому тракті. Бактерії стійкі до дії агресивного вмісту верхніх відділів

травного каналу – хлористоводневої кислоти, пепсину, жовчних кислот. Потрапляючи в тонкий кишечник, вони адгезують до клітин кишкового епітелію, запобігаючи цим адгезії патогенних мікробів, і починають інтенсивно рости. Результатом метаболічної активації бактерій є синтез протеолітичних ферментів, які активізують ріст лактобацил, а антибактеріальні субстанції, які при цьому виділяються, пригнічують ріст умовно патогенної і патогенної мікрофлори, адено- і ротавірусів. *B. clausii* стимулюють клітинний і гуморальний імунітет, що особливо важливо у випадку кишкових інфекцій; синтезують вітаміни й амінокислоти [32].

Вищеописане засвідчує роль пробіотичних препаратів, зокрема на основі *B. clausii*, у відновленні порушень роботи ШКТ як у дорослих, так і у дітей.

3.2. Розрахунок річної потреби

Згідно інформації, наведеної раніше, дисбактеріоз та гострі кишкові інфекції частіше спостерігаються у дітей, тому доцільно дослідити дану вікову групу.

В Україні на початок 2022 року проживало 7 348 531 дітей віком від 0 до 18 років, що складало 17,9% від загальної чисельності постійного населення України. Дані розподілу дітей за віком засвідчують, що чисельність дітей віком від 5 до 9 років становила 2 221 600 осіб, від 10 до 14 років – 2 331 500 осіб, від 15 до 17 років – 1 228 600 осіб [33].

Враховуючи, що на ринку України представлено конкурентні пробіотичні препарати на основі *B. clausii* (див. *таблицю 1.1*), які також користуються попитом у споживачів, для подальшого розрахунку річної потреби приймаємо, що можливо забезпечити пробіотиком 5 % цільової групи дітей віком від 5 до 9 років. Отже, річна потреба препарату розраховуватиметься для $2\,221\,600 \text{ осіб} \times 0,05 = 111\,080 \text{ осіб}$.

**Порівняльна таблиця пробіотичних препаратів, що у своєму складі містять
спори *Bacillus clausii* представлених на ринку України**

Назва препарату	Лікарська форма	Кількість доз на добу для 1 людини, шт	Вміст КУО на дозу	Курс лікування, діб	Узагальнена к-ть доз на курс, шт	Ціна, грн*	Виробник	Джерело
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ентерожерміна капс. №12	Капсули №12	2	2×10^9	12	24	221, 68	Sanofi, Італія	[34]
Ентерожерміна сусп. оральн. фл. 5мл №10	Суспензія оральна	2	2×10^9	12	24	226, 22	Sanofi, Італія	[35]
Ентерожерміна форте сусп. орал. фл. 5мл №10	Суспензія оральна	1	4×10^9	10	10	283, 05	Sanofi, Італія	[36]
Євро-Біотик Суспензія оральна в флаконах по 5 мл 10 шт	Суспензія оральна	2	<i>Bacillus clausii</i> UBBC-07 2×10^9	14	28	266, 55	ЮНІК БІОТЕК ЛІМІТЕД, Індія	[37]
Ентерожерміна форте суспензія оральна в флаконах по 5 мл 10 шт	Суспензія оральна	1 (5 мл)	4×10^9	5-10	5-10	335, 00	ОПЕЛЛА ХЕЛСКЕ А ІТАЛІ С.Р.Л, Італія	[38]
Ентерожерміна форте суспензія оральна в флаконах по 5 мл 5 шт	Суспензія оральна	1 (5 мл)	4×10^9	5-10	5-10	208, 3	ОПЕЛЛА ХЕЛСКЕ А ІТАЛІ С.Р.Л, Італія	[39]

Примітка. * - Ціни наведено станом на травень 2024 р.

Згідно інструкції до препарату Ентерожерміна виробництва «Sanofi-Aventis», Італія [8], дітям віком від 5 років рекомендовано приймати по 1-2 капсули на добу. При цьому, пробіотики рекомендовані до застосування після завершення противірусної терапії, щонайменше 5–7 днів після зникнення симптомів [41].

Приймаємо кратність прийому пробіотика 2 рази на добу курсом протягом 7 днів. Тоді для лікування 1 дитини віком від 5 до 9 років кількість капсул становить $2 \times 7 = 14$ шт., а для лікування 111 080 дітей:

$$2 \times 7 \times 111\,080 = 1\,555\,120 \text{ капсул.}$$

Згідно з інструкцією, 1 капсула містить полірезистентного штаму *Bacillus clausii* 2×10^9 КУО/г [8].

З інформаційних джерел відомо, що вага однієї капсули пробіотика становить близько 0,5 г [8].

Для зручності проведення подальших розрахунків приймаємо, що в 1 капсулі міститься близько 0,01 г біомаси *Bacillus clausii*, решта маси припадає на допоміжні речовини та оболонку.

Тоді у складі 1 555 120 капсул міститься:

$$1\,555\,120 \times 0,01 = 15\,551 \text{ г} = 15,55 \text{ кг біомаси } B. \text{ clausii.}$$

Таким чином, з метою забезпечення річної потреби в пробіотику Ентерожерміна для лікування та профілактики дисбактеріозу і гострих кишкових інфекцій у 111 080 дітей віком від 5 до 9 років з врахуванням препаратів-аналогів (табл. 3.1) необхідно 15,55 кг біомаси *B. clausii*.

3.3. Розрахунок потужності виробництва пробіотику Ентерожерміна

Bacillus clausii утворює 8,3 г/л протягом 34 годин процесу виробничого біосинтезу [13], так як для виробництва препарату необхідно використовувати бактеріальні спори, а не біомасу, приймаємо що вміст спор в біомасі становить 80 % [10]. Тоді необхідний об'єм культуральної рідини для одержання 15,55 кг спор становитиме:

$$V = \frac{15\,550}{8,3 \times 0,8} = 2\,341,8 \text{ л}$$

Із врахуванням втрат цільового продукту на стадіях виділення та очищення готового продукту 65 %, об'єм культуральної рідини становитиме:

$$V_{кр} = 2\,341,8 \text{ л} / (1-0,65) = 6\,691 \text{ л}$$

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) 210. Тоді кількість продукту на добу ($V_{д}$) становить:

$$V_{д} = V_{кр}/T_{рд} = 6\,691 / 210 = 31,86 \text{ л}$$

Далі визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{ц} = V_{кр} / ((V_{д} \times T_{цф})/24) = 6\,691 / ((31,86 \times 40)/24) = 126 \text{ циклів},$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 34 год).

Далі розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ($V_{крц}$):

$$V_{крц} = K_1 \times V_{д} \times T_{цф} / 24 = 1,1 \times 31,86 \times 40 / 24 \approx 58,41 \text{ л},$$

де K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій.

Тоді ферментер для отримання 58,41 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,6 матиме геометричний об'єм:

$$V_{г} = V_{крц}/K_{зап} = 58,41/0,6 = 97,35 \text{ л},$$

де $K_{зап}$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

Отже, для виробничого культивування спор *Bacillus clausii* приймаємо стандартний за геометричним розмірами ферментер об'ємом 100 л.

3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 100 л

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 58,41$ л культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%)) становитиме:

$$V_{роб.(1)} = \frac{V_{кр}}{1-E_{ф}} = \frac{58,41}{1-0,1} = 64,9 \text{ л},$$

де $E_{ф}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий синтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 64,9$

л.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зан} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{ф.(1)} = 64,9/0,6 = 108,2$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 100$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зан.(1)} = \frac{V_{роб.(1)}}{V_{сф}} = \frac{64,9}{100} = 0,65$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{пс1} = \frac{V_{роб.1}}{1 + X_{ф}} = \frac{64,9}{1 + 0,1} = 59 \text{ л}$$

де $X_{ф}$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{пм(1)} = V_{роб.(1)} - V_{пс(1)} = 64,9 - 59 = 5,9 \text{ л}$$

3.4.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 10 л

Для напрацювання 5,9 л культуральної рідини кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб.(2)} = \frac{V_{пм1}}{1 - E_{ін}} = \frac{5,9}{1 - 0,1} = 6,6 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін.} = 6,6/0,6 = 11,1$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{сін} = 10$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зан.(2)} = \frac{V_{роб.2}}{V_{сін}} = \frac{6,6}{10} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс(2)} = \frac{V_{роб.2}}{1 + X_{ін}} = \frac{6,6}{1 + 0,1} = 6 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм}(2)} = V_{\text{роб.}(2)} - V_{\text{пс}(2)} = 6,6 - 6 = 0,6 \text{ л}$$

3.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для отримання інокуляту в колбах на качалці

Об'єм посівного матеріалу для засіву інокулятора об'ємом 10 л становить 600 мл. Таку кількість отримують культивуванням клітин продуцента у колбах на качалці об'ємом в 750 мл та коефіцієнтом заповнення 0,2.

Кількість колб при цьому становитиме:

$$n_{\text{колб}} = 600 / (750 \times 0,2) = 4 \text{ шт.}$$

Згідно проведених розрахунків, процес вирощування інокуляту для забезпечення виробничого біосинтезу біомаси *B. clausii* у ферментері 100 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 необхідно здійснити протягом двох етапів (інокулятор 10 л та колби на качалці).

Таблиця 3.2

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

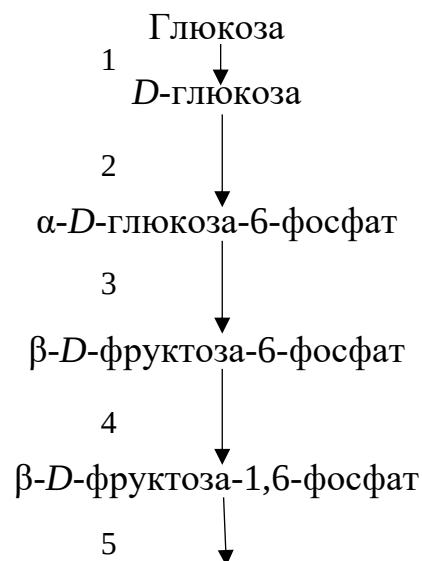
№ стадії	Об'єм культуральної рідини $V_{\text{кр}}$, м ³ (л)	Уточнений об'єм культуральної рідини $V_{\text{роб.}}$, м ³ (л)	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$, м ³ (л)	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$, м ³ (л)	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$, частка	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{ст}}$, м ³ (л)
1	2	3	4	5	6	7
III	58,41	64,9	5,9	59	0,6	100
II	5,9	6,6	0,6	6	0,6	10
I	0,6	0,66	0,06	0,6	0,2	4 колби

РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Джерелом вуглецю та енергії при рості *Bacillus clausii* виступає глюкоза. Для створення катаболічного шляху глюкози обираємо наведений у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [42] типовий штам *Alkalihalobacillus clausii* KSM-K16.

Перетворення глюкози відбувається шляхом Ебдена-Меєргофа-Парнаса. Спочатку глюкоза за участю глюкозоспецифічного ферменту (КФ 2.7.1.69) перетворюється на *D*-глюкозу, далі за дією глюкозокінази (КФ 2.7.1.2) перетворюється на α -*D*-глюкозу-6-фосфат. За дії глюкозо-6-фосфатізомерази (КФ 5.3.1.9) утворюється β -*D*-фруктоза-6-фосфат. За ферменту 6-фосфофруктокінази (КФ 2.7.1.11) синтезується β -*D*-фруктоза-1,6-фосфат, далі утворюється Гліцеральдегід-3-фосфат за ферменту фруктозо-дифосфаталиази (КФ 4.1.2.13). За дії гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) утворюється Гліцерат-1,3-фосфат, далі утворюється гліцерат-3-фосфат за ферменту фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3). За дії ферменту 2,3-бісфосфогліцерат-залежна-фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11) утворюється гліцерат-2-фосфат. Синтез фосфоенолпірувату відбувається за дії енолази (КФ 4.2.1.11), за дії піруваткінази (КФ 2.7.1.40) утворюється піруват, що є кінцевою стадією шляху перетворення глюкози (рис. 4.1).



НУХТ 04.02.24. КР ПЗ

Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата	Розділ 4. Біосинтез цільового продукту		
Розроб.	Борова М.О.				Літера	Аркуш	Аркушів
Перевір.	Старовойтова С.О.					35	35
Консульт.					Кафедра БТМ		
Н. контр.							
Зав.кафедр.	Стадніков В.П.						

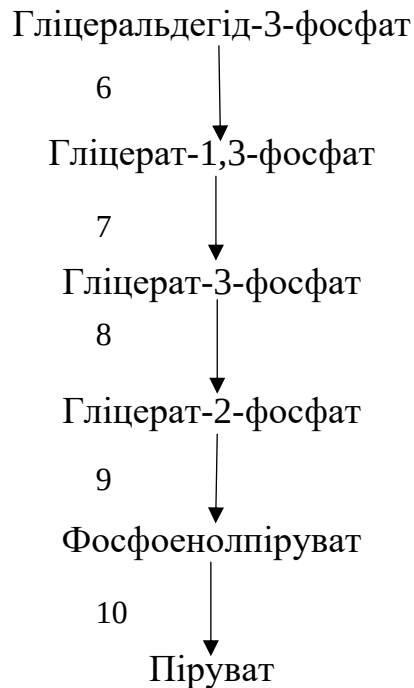


Рис. 4.1. Катаболізм глюкози шляхом Ембдена-Меейргофа-Парнаса

Ферменти: 1 - глюкозоспецифічний фермент (КФ 2.7.1.69); 2 - глюкозокіназа (КФ 2.7.1.2); 3 - глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 4 - 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 5 - фруктозо-дифосфаталдолаза (КФ 4.1.2.13); 6 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7 - фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 8 - 2,3-бісфосфогліцерат-залежна-фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 9 - енолаза (КФ 4.2.1.11); 10 - піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Біосинтез біомаси біологічним агентом *Bacillus clausii* включає синтез основних органічних сполук, що є складовими мікробної клітини (білки, полісахариди, ліпіди та нуклеїнові кислоти). Під час росту *Bacillus clausii* з використанням глюкози як джерела вуглецю за дії ферменту дигідроліпоамідацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.12) утворюється ацетил-КоА, який далі залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК). Основними попередниками амінокислот в якому є оксалоацетат та оксоглутарат.

Білки складаються з амінокислот, які більшість організмів здатні синтезувати *de novo*. Основні витрати енергії у вигляді отриманих при диханні молекул АТФ витрачається на полімеризацію амінокислот.

Попередником аланіну, валіну та лейцину є піруват, аспартат, аспарагін, метіонін, лізин, треонін, ізолейцин - оксалоацетат. Глутамат, глутамін, аргінін, пролін утворюються з такого попередника як 2-оксоглутарат, серин, гліцин, цистеїн з 3-фосфогліцерату. Біосинтез фенілаланіну, тирозину, триптофану відбувається за таких попередників, як фосфоенопіруват, еритрозо-4-фосфат, що є складовими пентозо-фосфатного циклу, а синтез гістидину з 5-Фосфорибозил-1-пірофосфат за участю АТФ.

Синтез *L*-валіну відбувається шляхом перетворення пірувату як попередника амінокислоти на (S)-2-Ацетолактат під дією ферменту ацетолактатсинтаза (КФ 2.2.1.6), подальше перетворення на 3-Гідрокси-3-метил-2-оксобутаноат за дії кетол-кислотної редуктоізомерази (КФ 1.1.1.86), далі на (R)-2,3-Дигідрокси-3-метилбутаноат за кетол-кислотна редуктоізомерази (КФ 1.1.1.86), перетворення на 2-Оксоізовалерат за ферменту дигідрокси-кислота дегідротаза (КФ 4.2.1.9) і подальший синтез валіну за ферменту аміотрансфераза з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42) [43].

Попередником синтезу лейцину є піруват. Утворення *L*-лейцину відбувається шляхом перетворення 2-Оксоізовалерату на (2S)-2-Ізопропімалат за ферменту 2-ізопропімалатсинтаза (КФ 2.3.3.13), далі утворення 2-Ізопропімалат за дії ферменту 3-ізопрпімалатдегідратаза (КФ 4.2.1.33), перетворення на (2R,3S)-3-Ізопропімалат за ферменту 3-ізопрпімалатдегідратаза (КФ 4.2.1.33), далі (2S)-2-Ізопропіл-3-оксосукцинат за ферменту 3-ізопропімалатдегідротаза (КФ 1.1.1.85) і подальший синтез лейцину [43].

Біосинтез *L*-ізолейцину з пірувату відбувається його перетворенням на (S)-2-Ацето-2-гідроксибутаноат за дією ферменту ацетолактатсинтаза (КФ 2.2.1.6), далі перетворення у (R)-3-Гідрокси-3-метил-2-оксопентаноат за ферменту кетол-кислотна редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86), далі (R)-2,3-Дигідрокси-3-метилпентаноат за ферменту кетол-кислотна редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86), перетворення на (S)-3-Метил-2-оксопентаноат за дією ферменту дигідрокси-кислота дегідротаза (КФ 4.2.1.9) і синтез ізолейцину за ферменту аміотрансфераза з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42) [43].

Пуринові та піримідинові нуклеотиди утворюються з інтермедіатів пентозо-фосфатного циклу. Для синтезу ЦТФ Карбамоїлфосфат утворюється з NH_3 , CO_2 і двох молекул АТФ за участю фермента карбамоїлфосфатсинтетази (КФ 6.3.5.5), аспарат утворюється з інтермедіату ЦТК – оксалоацетату трансамінуванням з глутаматом. В свою чергу попередниками ГТФ та АТФ є рибозо-5-фосфат.

Клітинна стінка *Bacillus clausii* товста та складається з муреїну. Першим етапом для синтезу полісахариду є перетворення глюкозо-6-фосфат, що на глюкозамін-6-фосфат. Попередники пептидоглікану - УДФ-N-ацетилмурамова кислота та УДФ-N-ацетилглюкозамін також синтезуються з глюкозамін-6-фосфату [43].

Синтез ліпідів відбувається за допомогою попередника 3-фосфогліцерина, що є продуктом синтезу діоксиацетонфосфату – проміжного продукту гліколізу за ферменту тріозифосфатізомераза (КФ 5.3.1.1). Біосинтез жирних кислот відбувається перетворенням Ацетил-КоА на Ацетил-АПБ і Кофермент А під дією Ацил-переносного білка (АПБ). Далі Ацетил-КоА і АТФ і CO_2 під дією ферменту ацетил-КоА-карбоксилаза (КФ 6.4.1.2) перетворюються на Малоніл-КоА, АДФ та Фн. Після цього відбувається приєднання до ацетил-АПБ C_2 -фрагментів у формі малоніл-КоА. Біосинтез фосфатидної кислоти починається з реакції 3-Фосфогліцерину та Ацил-АПБ з утворенням Ацил-3-фосфогліцерину та АПБ. Далі Ацил-3-фосфогліцерин залучається до реакції з Ацил-АПБ і утворюється Діацил-3-фосфогліцерин та АПБ. Діацил-3-фосфогліцерин в реакції з ЦТФ утворює ЦДФ-діацилгліцерин та ФнФн. Дана реакція є попередньою реакцією для утворення фосфоліпідів. Реакція Діацил-3-фосфогліцерину з УДФ-глюкозою утворює гліколіпіди, УДФ та Фн. У свою чергу синтез УДФ-галактози відбувається шляхом перетворення Глюкозо-6-фосфату на Глюкозо-1-фосфат під дією осфоглюкомутази (КФ 5.4.2.2). Далі Глюкозо-1-фосфат у реакції з УТФ приводить до утворення УДФ-глюкози, приєднується ФФ. Останнім етапом є перетворення УДФ-глюкози на УДФ-галактозу.

Отже, ростовий субстрат для культивування *Bacillus clausii* транспортується в клітину та в процесі метаболізму утворюються проміжні продукти, що

використовуються як попередники синтезу амінокислот (піруват, оксалоацетат, 2-оксоглутарат, фосфоенолпіруват), жирних кислот (ацетил-КоА), нуклеїнових кислот (рибозо-5-фосфат, аспартат), полісахаридів (нуклеозиддифосфатпохідні вуглеводів). Шляхи катаболізму ростового субстрату для отримання біомаси *Bacillus clausii* наведено згідно даних KEGG [42].

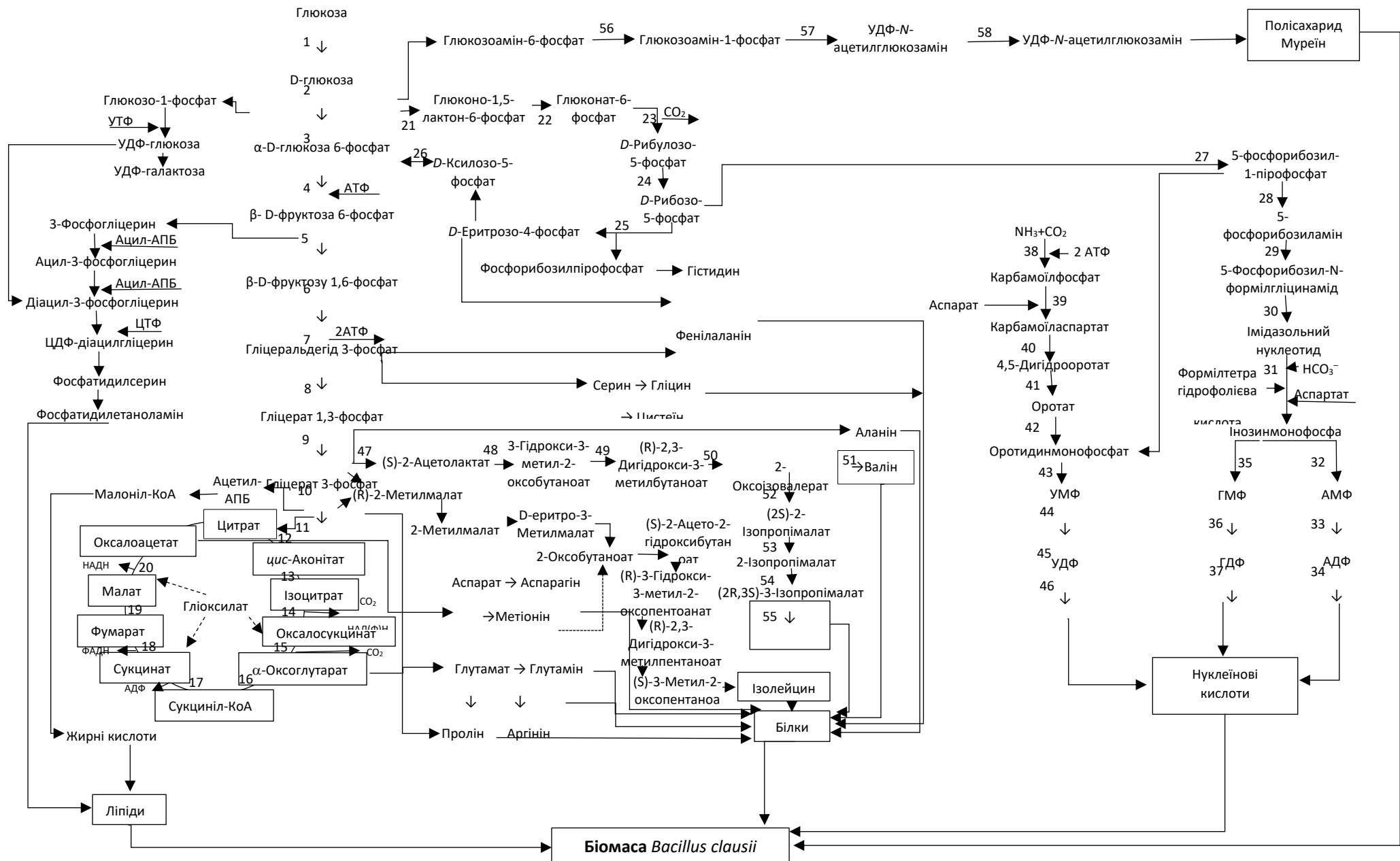


Рис. 4.2. Схема біотрансформації субстрату біологічним агентом *Bacillus clausii*

для отримання біомаси, як основи препарату Ентерожерміна

Ферменти: 1 - глюкозоспецифічний фермент (КФ 2.7.1.69); 2 - глюкозокіназа (КФ 2.7.1.2); 3 - глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 4 - 6-фосфоглюкокіназа (КФ 2.7.1.11); 5 - фруктозо-дифосфатацетилтрансфераза (КФ 4.1.2.13); 6 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7 - фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 8 - 2,3-бісфосфогліцерат-залежна-фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 9 - піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 10 - піруватдегідрогеназа (КФ 2.3.1.12); 11 - цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 12 - аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 13 - аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 14 - ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 15 - ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 16 - 2-оксоглутаратдегідрогеназа (КФ 2.3.1.61); 17 - сукциніл-КоА-синтаза (КФ 6.2.1.5); 18 - сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1); 19 - фумаратгідратаза (КФ 4.2.1.2); 20 - малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 21 - глюкозо-6-фосфат-1-дегідрогеназа (КФ 1.1.1.49); 22 - 6-фосфоглюконолактоназа (КФ 3.1.1.31); 23 - 6-фосфоглюконатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.44); 24 - рибозо-5-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.6); 25 - трансальдолаза (КФ 2.2.1.2); 26 - транскетолаза (КФ 2.2.1.1); 27 - рибозофосфатпірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1); 28 - фосфорибозиламінгліциллігаза (КФ 6.3.4.13); 29 - фосфорибозилгліцинамідформилтрансфераза (КФ 2.1.2.2); 30 - фосфорибозилформілгліцинамідінциклолігаза (КФ 6.3.3.1); 31 - фосфорибозиламіноімідазолкарбоксиамідформилтрансфераза (КФ 2.1.2.3); 32 - фосфорибозиламіноімідазолкарбоксиамідформилтрансфераза (КФ 2.1.2.3); 33 - аденілаткіназа (КФ 2.7.4.3); 34 - нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 35 - ГМФ-синтаза (КФ 6.3.5.2); 36 - гуанілаткіназа (КФ 2.7.4.8); 37 - нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 38 - карбамоїлфосфатсинтаза (КФ 6.3.5.5); 39 - аспараткарбоамідтрансфераза (КФ 2.1.3.2); 40 - дигідрооротаза (КФ 3.5.2.3); 41 - дигідрооротатдегідрогеназа (КФ 1.3.98.1); 42 - уридинмонофосфатсинтаза (КФ 2.4.2.10); 43 - уридинмонофосфатсинтаза (КФ 4.1.1.23); 44 - уридилаткіназа (КФ 2.7.4.22); 45 - нуклеотиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 46 - ЦТФ-синтаза (КФ 6.3.4.2); 47 - ацетолактатсинтаза (КФ 2.2.1.6); 48 - кетол-кислотна редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86); 49 - кетол-кислотна редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86); 50 - дигідрокси-кислота дегідратаза (КФ 4.2.1.9); 51 - амінотрансфераза з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42); 52 - 2-ізопропімалатсинтаза (КФ 2.3.3.13); 53 - 3-ізопрпімалатдегідратаза (КФ 4.2.1.33); 54 - 3-ізопрпімалатдегідратаза (КФ 4.2.1.33); 55 - 3-ізопропімалатдегідратаза (КФ 1.1.1.85); 56 - фосфоацетилглюкозамінмутаза (КФ 5.4.2.3); 57 - УДФ-N-ацетилглюкозаміндифосфорилаза (КФ 2.7.7.23); 58 - N-ацетилглюкозамінова кислота синтаза (КФ 4.2.1.126); 59 - 3-ізопріималатдегідратаза (КФ 4.2.1.35); 60 - 3-ізопріималатдегідратаза (КФ 4.2.1.35); 61 - 3-ізопропімалатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.85); 62 - треоніндегідратаза (КФ 4.3.1.19); 63 - ацетолактатсинтаза (КФ 2.2.1.6); 64 - кетол-кислотна редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86); 65 - кетол-кислотна редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86); 66 - дигідрокси-кислота дегідратаза (КФ 4.2.1.9); 67 - амінотрансфераза з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42).

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва

Bacillus clausii – алкалофільний мезофільний аеробний мікроорганізм, оптимальним рівнем рН для росту якого є 7,0-10,0 з температурою культивування 35-40°C з необхідністю аерації [7]. Згідно визначених характеристик біологічного агента, під час культивування можлива контамінація сторонніми мікроорганізмами тому важливо передбачити забезпечення асептичних умов шляхом стерилізації обладнання та комунікацій, поживного середовища, аераційного повітря, піногасників. Для запобігання контамінації в ферментері потрібне створення надлишкового тиску подачею стерильного аераційного повітря. Згідно з визначеними умовами культивування, одержання біомаси слід здійснювати глибинним способом. За використанням даного способу культуру вирощують у рідкому середовищі при перемішуванні та аерації.

Найбільша концентрація біомаси продуцента досягається на початку стаціонарної фази росту тому культивування слід проводити періодичним способом. Періодичне культивування є ефективним способом зниження утворення катаболітів та побічних продуктів. Для періодичного культивування *Bacillus clausii* зазвичай використовуються ферментери з механічним перемішуванням та контролем температури. Перевагою даного виду культивування є те, що воно дозволяє мінімізувати втрати поживних речовин та забезпечує оптимальні умови для росту та розвитку мікроорганізмів, що у результаті може підвищити вихід біомаси та покращити якість препарату, що виробляється.

5.1 Вибір типу ферментера

У промислових масштабах ферментери можуть бути дуже корисними для отримання біомаси мікроорганізмів у великих концентраціях. Вони дозволяють ефективно вирощувати бактерії та забезпечувати високу якість продукту за допомогою регулювальних систем та систем очищення. Тип ферментера для культивування *Bacillus clausii* залежить від масштабу процесу та вимог до контролю

					НУХТ 04.02.24. КР ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата				
Розроб.	Борова М.О.				Розділ 5. Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва	Літера	Аркуш	Аркушів
Перевір.	Старовойтова С.О.						42	123
Консульт.						Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Зав.кафедр.	Стадніков В.П.							

параметрів культивування. У процесі культивування важливо передбачити можливість аерації зі швидкістю 0,6 атм і регульовану кількість обертів перемішуючого пристрою у ферментері, так як біологічний агент є аеробом. Оптимальною частотою перемішування є 400 об/хв, що забезпечує достатню інтенсивність для рівномірного розподілення повітря та поживних речовин у всьому об'ємі ферментера.

Ферментер для культивування мікроорганізму для одержання біомаси для виготовлення пробіотичного препарату Ентерожерміна з робочим об'ємом 100 л можна замовити в українського машинобудівного заводу ТМ ПРОМБІТ (ТОВ НВК Промфарм), що виробляють ферментери, біореактори згідно стандартам GMP, SCADA, відповідності Директиві 2009/105/ЄС (SPV). Ферментер оснащений барбортером, датчиком рН, датчиком рівня рідини в літрах, що під'єднано до автоматизованої системи управління, турбінною мішалкою та датчиком температури. У обраному ферментері турбінна мішалка складається з трьох горизонтальних роторів, що обертаючись навколо своєї осі, забезпечують ефективне перемішування рідини та диспергування газу, підтримувана частота обертів становить 200-400 об/хв. Мішалка є ефективним пристроєм для забезпечення аераційних умов під час культивування, дозволяє зменшити витрати повітря. Ферментер оснащений теплообмінною сорочкою, що дозволяє підтримувати температуру в корпусі від 5 до 150°C та нижнім штуцером для зливу конденсату. Матеріал виготовлення в контакті з продуктом - сталь AISI 316L. Ферментер оснащений манометром для контролю тиску [45].

Отже, для проведення виробничого біосинтезу *Bacillus clausii* необхідно замовити ферментер, що забезпечує контроль параметрів культивування, таких як температура, аерація, рН, наявний перемішуючий пристрій. Важливо передбачити приготування розчину титрувального агенту для підтримки значення рН. Для контролю процесів, які протікають, прилад повинен бути оснащений відповідними датчиками, що під'єднуються до автоматизованої системи управління.

5.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.

Важливим етапом культивування є отримання великої кількості стерильного аераційного повітря. Для роботи з посівною культурою та інокулятом, повітря в боксах та лабораторії стерилізують за допомогою УФ-ламп шляхом опромінення ультрафіолетовими променями. Для подачі повітря у ферментатор найефективнішим способом очищення є фільтрація. Підготовка повітря проходить у декілька етапів. Перший етап полягає у заборі повітря вертикальною трубою за допомогою турбокомпресора на висоті 2 - 3м від найвищої точки будівлі, де концентрація мікроорганізмів стабілізована. Повітря для аерації не повинно містити механічних домішок. Для цього здійснюється подача у фільтри попереднього очищення, де відбувається грубе очищення, звільнення від пилу та бактерій. Як фільтр грубого очищення можна використовувати DustFilter E100 від компанії «GrowPro» (Україна). виготовлений з вологостійкої фанери, матеріалом фільтра є неткані полотна із синтетичних волокон, товщиною 20 мм [46]. Наступний етап полягає у стисненні повітря у турбокомпресорі до 0,35–0,5 МПа для подолання опору матеріалів у фільтрах та подолання гідравлічного опору для кращого розчинення повітря у культуральній рідині. Це призводить до підвищення його температури (120-250°C) і, перед подачею на головний фільтр, повітря слід охолодити. Головний фільтр - фільтр повітряний касетний з класом очищення F7 від компанії «ВЕНТ-ФІЛЬТР» (Україна) [47]. Для охолодження та зменшення вмісту вологи у повітрі використовують водяні теплообмінні апарати. Також повітря подається у ресивер для остаточного видалення вологи та вирівнювання тиску.

На третьому етапі, після пропуску повітря через головний фільтр, воно подається на індивідуальні стерильні фільтри, встановлені безпосередньо перед ферментатором. Індивідуальні фільтри обираються фільтри тонкого очищення ДК-350/Д-23 від компанії «Інтерхолд» (Україна) [48]. Ступінь очищення аераційного повітря для його використання повинна становити 99,9999% [49].

Як було зазначено раніше, процес підготовки повітря проходить у три послідовних взаємозв'язаних етапи та повинен контролюватись і підтримуватись на оптимальному рівні напротязі всього часу культивування. Для цього ферментер має

бути оснащений системами контролю тиску та потоку повітря, що дають змогу контролювати стабільність та точність підтримання визначених умов аерації.

5.3. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів

Підготовка персоналу, приміщень та обладнання регулюється згідно СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020. Лікарські засоби. Належна виробнича практика. Дезінфекція – важливий етап підготування фармацевтичних та біотехнологічних підприємств. Загалом, це сукупність способів повного, часткового або селективного ураження потенційно-патогенних мікроорганізмів на об'єктах навколишнього середовища з метою розриву шляхів передачі збудників захворювань від джерел інфекції до сприйнятливих людей. Усі засоби для дезінфекції було обрано згідно з «Державним реєстром дезінфекційних засобів України 2020 р.» [50]. Для запобігання формування резистентності пропонується використовувати метод ротації засобів. Тому обрано по 2 дезінфікувальних засобів для обробки приміщень, обладнання та рук персоналу.

Засіб мийний з дезінфікувальним ефектом «КлінДез 401» («Clean&Dez 401») випускається у формі рідкого концентрату жовтуватого кольору з характерним запахом хлору. Вихідний вміст активного хлору в концентрації засобу 6,0% — 9,0%.

Під час зберігання засобу можливе випадання осаду, що не впливає на якість дезінфікувальних властивостей засобу. Робочі розчини засобу мають антикорозійні, стабілізувальні, змочувальні, емульгувальні та мийні властивості.

Не ушкоджує об'єкти, виготовлені з корозійностійких металів (зокрема з нержавіюча, хромонікового, низьковуглецевої сталі, заліза, алюмінію), скломалі, матеріалів, покритих нікелем і латунню, скла, силікону, пластмас, гуми на основі силіконового та натурального каучуку, полімерних матеріалів, пофарбованих і нефарбованих дерева, кахлю, керамічної плитки, лінолеуму, бетону, фарфору, фаянсу.

Склад, %: іпохлорит натрію — до 50%; допоміжні речовини — антикорозійні, стабілізувальні домішки; аніонні та неіоногенні ПАВ. Вихідний вміст активного хлору в концентрації засобу 6,0% — 9,0%.

Метод використання: протирання, зрошення, занурення, замочування.
Рекомендована концентрація: 0,015-2%, залежно від режиму дезінфекції; стерилізація — 0,25-2%

Фасування: 5 л, 10 л [51].

Як варіативний засіб пропонується обрати «КлінДез 401» через його невисоку вартість за 1 л (70 грн) та відносно невелику концентрацію для розчину, що становить 1,5%. Так як дезінфікувальні засоби рекомендується змінювати кожні 5-6 днів, щоб запобігти появі стійких форм мікроорганізмів можна використовувати такий дезінфікуючий засіб з мийним ефектом, як Дезосепт Форте.

Дезосепт Форте. ТУ У 24.4-30906521-001-2000.

Препарат використовують для дезінфекції технологічного обладнання (резервуари, ємності, теплообмінники, ліній розливу, упаковки і розфасовки), трубопроводів, інвентарю, тари, санітарно-побутових приміщень. Здатен добре змішуватись з водою. Рекомендується використовувати для обладнання, виготовленого зі сталі, алюмінію, оцинкованого заліза, емалі, гуми.

Препарат має широкий температурний діапазон застосування та на поверхні обладнання розкладається на нешкідливі залишки, що легко змиваються водою. Надоцтова кислота на оцтову кислоту, воду та кисень, що також має екологічніший ефект через не забруднення навколишнього середовища.

Склад: пероксид водню у межах 5,0-20,0%, надоцтова кислота у межах 5,0-10,0% та оцтова кислота у межах 5,0-10,0%.

Метод застосування: дезінфекція твердих поверхонь приміщень, обладнання, санітарно-технологічного устаткування в закладах соціального захисту; вогнищах інфекційних захворювань та подібне. Рекомендована концентрація - 0,15%, готують окремо розчинюючи у 1 л води 15 мл концентрованого препарату та перемішують 1-2 хв [52].

Для обробки обладнання пропонується чергувати такі засоби, як Біомой та Ладоксин, які будуть чергуватись для запобігання резистентності.

Біомой. ТУ У 22902465.005-96.

Біомой (лужна фосфатаза) випускається у вигляді концентрату в пластиковій пляшці об'ємом 1 л., виявляє високу мийну активність при температурі не вище $40\pm 5^{\circ}\text{C}$. Перевагою є те, що даний розчин не ушкоджує об'єкти з нержавіючої сталі, чорного металу з антикорозійним покриттям, алюмінію, скла, гуми, полімерних матеріалів, кахлю, емалі. Засіб належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007), не виявляє кумулятивні, шкіряно-резорбтивні та алергенні властивості.

Склад: алкілбензолсульфонат натрію (сульфонол) 5,0-8,0; лужна протеаза 1,0-1,1 (діючий засіб); натрію карбонат; диспергатор; наповнювач.

Метод застосування: призначений для миття та стерилізації технологічного обладнання, інвентарю, комунікацій і тари. Готують у тарі будь-якого матеріалу шляхом розчинення у питній воді. Рекомендована концентрація - 0,5% [53].

Хлорантоїн. ТУ У 22902465.004-95.

Це дезінфікуючий засіб у вигляді порошку з запахом хлору. Розчинність у воді - не менше 20 г/дм³.

Склад: 1,3-дихлор-5,5-диметилгідантоїн (дихлорантин) – 21,5-23,5% (діюча речовина); 5,5-диметилгідантоїн – 12,5-16,5%; диспергатор - 9,0-12,5%; аніонні поверхнево-активні речовини – 3,2-5,0%; інгібітор корозії до 10,0%; наповнювач до 100,0%.

Метод застосування: профілактична дезінфекція, на фармацевтичних підприємствах, для миття технологічного обладнання. Рекомендована концентрація – 0,3-0,5% [54].

Персонал може слугувати найбільшим джерелом забруднення виробництва та готового продукту тому передбачається навчання при прийомі на роботу техніці безпеки та правилам санітарної підготовки, подальша перевірка даного персоналу на знання санітарної підготовки. Проводження медоглядів, підготовка технічного одягу та ін. Так для миття рук використовують рідке або туалетне мило, що намилюють під краном та змивають водопровідною водою. Далі обов'язкове оброблення рук дезінфікуючим засобом, в якості якого використовується антисептичний засіб

«Ладоксин» (ТУ У 20.2-40220141-001:2017), що має пролонгований антимікробний ефект.

Згідно інструкції до застосування, належить до малонебезпечних речовин, не виявляє шкірно-подразнюючих та сенсабілізуючих властивостей при одно- та багаторазовому нанесенні на шкіру, що є важливим показником для використання так як засіб застосовується у роботі людьми [55].

Форма випуску і фізико-хімічні властивості: спиртовий розчин, має характерний запах, однорідна прозора рідина, має рН – 4,7 – 7,5.

Засіб «Ладоксин» являє собою готовий до застосування розчин і не підлягає розведенню.

Деконтамінацію рук та шкіри у промисловості та об'єктах, де вимагається дотримання гігієнічних норм і правил гігієнічних норм і правил проводять шляхом нанесення засобу «Ладоксин» на сухі руки в об'ємі не менше 3,0 мл і втирають протягом 15-30 сек. до повного висихання, в подальшому не змивають. Шкіра повинна бути повністю вкрита засобом. Дезінфекцію рукавичок проводять шляхом нанесення «Ладоксину» на рукавички, що вже одягнені на руки персоналу, забезпечуючи при цьому контакт засобу з усіма поверхнями виробу, час знезараження становить 30-60 сек.

Склад: активно-діючих речовин – 1-пропанол – 30%, 2-пропанол – 40%, хлоргексидину біглюконат – 0,5%, перекис водню – 0,5%, необхідні функціональні добавки, в т.ч. для посилення і пролонгації специфічної дії засобу, вода очищена – до 100,0%.

Призначення: хірургічна антисептика рук медичного персоналу, персоналу закладів охорони здоров'я, гігієнічної антисептики рук персоналу лабораторій різних підпорядкувань, аптек та аптечних закладів, працівників фармацевтичної та мікробіологічної промисловості тощо.

Для альтернативного засобу для обробки рук персоналом для запобігання появи стійких форм мікроорганізмів пропонується використовувати антисептичний засіб «Квікцид» ТУ У 20.2-38261660-004:2015.

Склад: активно-діючі речовини – 1-пропанолу – 40%, 2-пропанолу – 35%, алкілметилбензиламоній хлорид – 0,15%, необхідні функціональні добавки до 100,0%.

Форма випуску та фізико-хімічні властивості: безбарвна рідина, рН – 4,7 – 7,5, не містить окислювачів, сумісний з усіма матеріалами, окрім чутливих до дії спиртів.

Спектр антимікробної дії: у відношенні грампозитивних та грамнегативних бактерій, збудників госпітальних інфекцій, штами стафілококу, ентеробактерій, псевдомонад, ентерогеморагічної кишкової палички, сальмонельозу, холери тощо. Перешкоджає виділенню резидентної мікрофлори шкіри з її глибоких шарів та має пролонговану протимікробну дію – не менше 3 годин, з можливістю продовжуватись до 5 годин в залежності від ступеню мікробного обсіменіння шкіри.

Застосовують для знезараження перед початком роботи та в кінці робочої зміни та в інших необхідних випадках. «Квікцид» 3,0 мл наносять на сухі руки і втирають протягом 15-30 сек. до повного висихання засобу на шкірі. Для обробки рук в рукавичках користуються подібною схемою і чекають повного висихання дезінфікуючого засобу. Норма витрат засобу 30-50 мл/м³ [56].

5.3.1. Розрахунок потреб у дезінфікувальних засобах

Виробничий процес проходить протягом 120 днів і потребує максимально асептичних умов. Приміщення буде включати ферментер 1,46 м³, інокулятор 1,45 м³, два реактори по 50 л – 3,18 м³ та два реактори 5 л – 0,6 м³, а також качалочні колби та качалка, інше виробниче обладнання [45, 57, 58, 59]. Згідно розмірів обладнання обирається ширина підлоги 6 м, враховуючи 1-1,5 метри відстані між обладнанням та стінами, довжина яких також приймається 6 м. Тоді площа підлоги та стелі становить 36 м².

Висота ферментеру становить 1,6 м, через це приймається, що виробничий процес буде проходити на одному поверсі. Висота стін буде оброблюватись на цю висоту. Отже, загальна площа обробки:

$$\sum F = (6 \text{ м} \times 6 \text{ м}) + (6 \text{ м} + 6 \text{ м} + 6 \text{ м} + 6 \text{ м}) \times 1,6 \text{ м} = 36 + 24 \times 1,6 = 96 \text{ м}^2$$

Площа комунікацій припускаємо, що буде становити половину, від вирахованої площі і дорівнює $96/2 = 48 \text{ м}^2$. Ефективність використання представлено у вигляді *табл. 5.1*.

Згідно розрахунків, у якості найбільш економічного засобу обирається Дезосепт Форте для обробки поверхонь і Біомой для обробки обладнання. Проте з часом рекомендується чергувати дезінфікувальні засоби для зменшення адаптації мікробіоти. До того ж, засоби, що використовуються для обробки обладнання можуть використовуватись для обробки підлоги, стель та поверхонь.

Таблиця 5.1

Узагальнена характеристика витрат миючих та дезінфікуючих засобів для виробництва Ентерожерміна

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концен-трація робочого розчину, %	Вартість 1 л (кг) мийного або дез. засобу, Грн/л(кг)	Вартість 1 л робочого розчину мийного або дез.засобу, Грн/л	Витрати роб.розчину, л/м ²	Ефективність використання дез.розчину, Е _{дз} , Грн/м ²
КлінДез 401	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога	1,0	70	0,7	0,3	20,16
Дезосепт Форте	Поверхні, стіни, вікна, двері	0,15	62,7	0,094	0,1	0,9
Біомой	Обладнання і комунікації	0,5	295	1,48	0,25	17,76
Хлорантоін	Обладнання і комунікації	0,5	440	2,2	0,25	26,4

Отже, згідно опрацьованих даних визначено, що основним засобом для дезінфекції поверхонь та приміщень слід обрати Дезосепт Форте, що має мінімальну вартість обробки 1м². На заміну йому буде слугувати КлінДез 401, дезінфікувальні засоби мають різні складові для попередження резистентності мікроорганізмів. Для обробки обладнання та комунікацій обирається Біомой з мінімальною вартістю обробки 1м², що дорівнює 17,76 грн/м². Альтернативним засобом рекомендується застосовувати Хлорантоін з відмінним від Біомой складом.

Всі обрані засоби можна використовувати на заміну одне одному і чергувати кожні 2-3 місяці для попередження утворення резистентних форм мікроорганізмів.

5.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Згідно з вищенаведеними розрахунками, виробничий біосинтез біомаси біологічного агенту проходить у ферментері об'ємом 100 л з коефіцієнтом заповнення 0,6, що містить 60,6 м³ поживного середовища. Отримання інокуляту відбувається у два етапи: у інокуляторі об'ємом 10 л та колбах на качалці у кількості 4 штук.

Для виробничого отримання біомаси *Bacillus clausii* використовується середовище наступного складу (г/л) [13]:

- глюкоза – 10;
- дріжджовий екстракт – 7;
- KNO₃ - 5,8;
- K₂HPO₄ - 4;
- Na₃C₆H₅O₇ - 4;
- MgSO₄ · 7H₂O - 0,5;
- CaCl₂ – 0,002;
- Na₂CO₃ – 10;
- Розчин мікроелементів 1% (об'ємна частка), що містить (г/л): Na₃C₆H₅O₇ - 10; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ – 0,1; FeSO₄ · 7H₂O - 2; CuSO₄ · 5H₂O - 0,2; ZnCl₂ – 0,2;
- рН середовища – 9,5-10.

Біологічний агент вирощують на простерилізованих середовищах для запобігання контамінації. Стерилізацію компонентів поживного середовища проводять у спеціальних умовах, що залежать від їх фізико-хімічних властивостей, тому доцільно для кожного етапу культивування розділити середовище на композиції.

5.4.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Стерилізацію здійснюють в автоклаві, через невеликий об'єм поживного середовища (0,6 л). Склад середовища для культивування можна розділити на такі композиції (в залежності від режиму стерилізації):

Композиція А: дріжджовий екстракт, глюкоза (режим стерилізації: 120°C, 20 хв).

Композиція Б: Na_2CO_3 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

Композиція В: K_2HPO_4 , KNO_3 (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

Композиція Г (запасний розчин солей): $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, CaCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

Розчини дріжджового екстракту та глюкози (композиція А) є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації. Солі (композиція Б, В) стерилізують окремо у вигляді розчинів для запобігання утворення нерозчинних фосфатів магнію та кальцію. Для приготування поживного середовища об'ємом 0,5 л у колбах на качалці доцільно зробити перерахунок вмісту компонентів (табл.5.2). Композицію А доцільно стерилізувати у колбі з більшим об'ємом (1 л), в яку потім будуть вноситись інші охолоджені і простерилізовані композиції.

Запасний розчин солей додається в об'ємній частці 1% на 1 л середовища, що становить 10 г/л або 6 г на 0,6 л середовища. Композиція Г готується окремо для додавання у невеликі об'єми середовища і деякі компоненти не можуть бути зважені на технічних вагах (табл.5.3) тому для зручності зважування солей запасний розчин готують об'ємом 100 мл із концентрацією збільшеною у 100 разів. Звідси для 0,6 л поживного середовища для колб на качалках додають 1 мл об'єму концентрованого запасного розчину солей. У більші об'єми поживного середовища композицію можна вводити з іншими солями використовуючи титрувальні агенти. Стерилізацію компонентів А, Б, В та Г здійснюють у автоклаві.

Таблиця 5.2

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,6 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	10	5	А	0,15
Дріжджовий екстракт	7	3,5		
Вода		150 мл		
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	4	2	Б	0,25
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5	0,25		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2	1		
Na ₂ CO ₃	10	5		
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	10	5		
Вода		250 мл		
KNO ₃	5,8	2,9	В	0,1
K ₂ HPO ₄	4	2		
Вода		100 мл		
CaCl ₂	0,002	0,001	Г	0,1
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,1	0,05		
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,2	0,1		
ZnCl ₂	0,2	0,1		
Вода		100 мл		

Таблиця 5.3

Розрахунок компонентів запасного розчину солей для вирощування у колбах на качалках

Об'єм середовища, л	Вміст, г			
	CaCl ₂	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	CuSO ₄ · 5H ₂ O	ZnCl ₂
0,5	0,001	0,05	0,1	0,1

5.4.2 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокулятор об'ємом 10 л

Стерилізація 6 л поживного середовища, необхідного для даної стадії, здійснюється у реакторі, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: дріжджовий екстракт, глюкоза (режим стерилізації: 120°C, 20 хв).

Композиція Б: Na_2CO_3 , CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, KNO_3 , K_2HPO_4 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 (режим стерилізації: 131°C , 40 хв).

Після стерилізації в окремому реакторі за температури 120°C протягом 20 хв композиція А подається у інокулятор за допомогою перистальтичного насоса. Солі (композиція Б) розчиняють у воді в окремому збірнику з додаванням титруючого агенту для регуляції рівня рН, з якого потім подають в посівний апарат перистальтичним насосом, де проводиться стерилізація за температури 131°C з контролем рН для запобігання утворення осаду.

Таблиця 5.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в посівних апаратах об'ємом 10 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	10	50	А	2
Дріжджовий екстракт	7	35		
Вода		1800 мл		
Конденсат		200 мл		
KNO_3	5,8	29	Б	4
K_2HPO_4	4	20		
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	4	20		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	2,5		
CaCl_2	0,002	0,01		
Na_2CO_3	10	50		
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	10	50		
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,1	0,5		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2	10		
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,2	1		
ZnCl_2	0,2	1		
Вода		3700 мл		
Конденсат		300 мл		

5.4.3 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту у ферментері об'ємом 100 л

Композиції, з яких складається поживне середовище об'ємом 50 л:

Композиція А: дріжджовий екстракт, глюкоза (режим стерилізації: 120°C , 20 хв).

Композиція Б: Na_2CO_3 , CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, KNO_3 , K_2HPO_4 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 (режим стерилізації: 131°C , 40 хв).

Приготування та стерилізація компоненту А відбувається за температури 120°C протягом 20 хвилин в окремому реакторі, подача в інокулятор здійснюється перистальтичним насосом. Солі композиції Б готують окремо в реакторі, розчиняють у воді та додають 6%-ий розчин HCl як титруючий агент для запобігання утворення осаду. Після цього подається в інокулятор за допомогою перистальтичного насоса для стерилізації з метою зменшення ризику контамінації.

Таблиця 5.4

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 100 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 60,6 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	10	500	А	20,6
Дріжджовий екстракт	7	350		
Вода		18000 мл		
Конденсат		2600 мл		
KNO_3	5,8	290	Б	40
K_2HPO_4	4	200		
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	4	200		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	25		
CaCl_2	0,002	0,1		
Na_2CO_3	10	500		
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	10	500		
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,1	5		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2	100		
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,2	10		
ZnCl_2	0,2	10		
Вода		37000 мл		
Конденсат		3000 мл		

5.5. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Для запобігання утворення нерозчинного осаду фосфатів кальцію та магнію при великих концентраціях наведеного поживного середовища їх, перед додаванням у ферментер, необхідно приготувати в окремому реакторі. У нього завантажують солі, потім воду і розчиняють солі за перемішування, після чого подають у ферментер.

Рівень рН доводять до значення 4 - 4,5 шляхом додавання нестерильного 6%-го розчину соляної кислоти (HCl). Стерилізацію проводять у ферментері, що обладнаний датчиком рН. Розчин солей стерилізують за температури 131°C.

Для подальшого підлучення середовища і доведення рівня рН до оптимального для культивування продуцента (7,0 - 7,5) використовують 6%-ий розчин NaOH, стерилізацію якого проводять у реакторі при температурі 131°C протягом 40 хвилин.

Об'єм титруючих агентів для доведення рівня рН до потрібного у середовищах об'ємом до 100 л беруть у невеликих об'ємах (0,2% від об'єму культуральної рідини). Для приготування використовуються колби. Необхідні кількості титрантів та їх підготовка для кожної стадії культивування наведено у *таблиці 5.5*.

Таблиця 5.5

Розрахунок об'ємів підготовки титруючих агентів для культивування

Об'єм поживного середовища, л	6% розчин HCl		6% розчин NaOH	
	Об'єм, мл	Особливості приготування	Об'єм, мл	Особливості приготування
6	12	У колбі об'ємом 100 мл	12	У колбі об'ємом 100 мл
59	120	У колбі об'ємом 200 мл	120	У колбі об'ємом 200 мл

Додатково у статті [13] для накопичення в культуральній рідині ферментного комплексу лужних протеаз в процесі культивування *Bacillus clausii* додається титруючий агент у вигляді розчину Na₂CO₃ з розрахунком 10 г на 1 л середовища. За його допомогою забезпечується оптимальний рівень рН 10. Карбонат натрію – це біла кристалічна речовина, добре розчинна у воді. Титруючий агент підготовлюють для додавання у виробничий ферментер об'ємом 100 л, для культивування в інокуляторі 10 л та у колбах на качалці 1 л.

Цитрат натрію, компоненти з сульфогрупою (магній сульфат, купрум сульфат, ферум сульфат), аміногрупою (парамолібдат амонію) у складі поживного середовища, аерація та постійне перемішування під час культивування призводять до утворення піни [61], що знижує якість процесу, тому доцільним є використання піногасників. З цією метою під час біосинтезу додають простерилізований жировий силіконовий піногасник SILFOAM® SE 47 виробника Wacker, Німеччина. Це

універсальний піногасник вартістю 191 грн/кг, являє собою емульсію молочного кольору типу масло у воді, має низьку в'язкість та високу стійкість до лужних і кислотних середовищ. Емульсію стерилізують окремо за допомогою інфузійного фільтра з мембраною 0,2 мкм і потім додають в інокулятор. Витрати піногасника складають 0,1-1% від об'єму культуральної рідини [62].

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого синтезу біомаси у ферментері об'ємом 0,1 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у три етапи. На першому етапі вирощування 600 мл посівного матеріалу буде відбуватись у колбах об'ємом 1 л на качалці. Другим етапом буде використання інокулятора об'ємом 10 л у процесі підготовки 6 л матеріалу. На третьому етапі 60 л посівного матеріалу одержують у ферментері об'ємом 100 л з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Технологічна схема культивування *Bacillus clausii* для отримання біомаси передбачає такі допоміжні роботи:

- Приготування 6%-го розчину хлоридної кислоти для підкислення розчину солей при стерилізації в колбах об'ємом 1 л, інокуляторі 10 л і ферментері 100 л;
- Приготування та стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію для підлужнення рН поживного середовища перед початком культивування;
- Приготування та стерилізація 1%-го розчину карбонату натрію разом з розчином солей для стабілізації рН середовища перед початком культивування в колбах об'ємом 1 л, інокуляторі 10 л та ферментаторі 0,1 м³;
- Приготування та стерилізація поживних середовищ.

РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання

У таблиці 6.1 наведено специфікацію технологічного обладнання, зображеного на апаратурній схемі у графічній частині.

Таблиця 6.1

Специфікація ділянки біосинтезу пробіотика Ентерожерміна

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	Повітрозабірник airer deltafan maxі. Продуктивність 1100 – 1800 м ³ /год Перепад тиску 25 – 40 Па. Компанія: «Deltafan» (Україна) [63]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр грубої очистки повітря DustFilter E100.Затримує частинки розміром > 10 мкм. Матеріал: вологостійка фанера Матеріал фільтра: неткані полотна із синтетичних волокон, товщина 20 мм. Компанія: «GrowPro» (Україна) [46]
К-3	Компресор	1	Компресор двоступінчатий з ремінною передачею Fini BK119-500F-7.5. Потужність 7,5 кВт. Максимальний тиск 10 бар. Продуктивність 840 л/хв. Кількість ступенів стиснення – 2. Компанія: «STORGOM» (Україна) [64]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник Roen Est дворядний 90-50. Призначений для нагрівання й охолодження повітря в системах повітряного опалення, вентиляції та кондиціонування повітря. Витрата повітря: 5 850 м ³ /год. Гідравлічний опір: 17,44 кПа. Максимально допустимий тиск: 1,6 МПа. Компанія: «Roen Est» (Італія) [65]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер повітряний вертикальний РВ 100.370. Місткість 0,1 м ³ . Робочий тиск 1,0 МПа. Робоча температура від -20 до +100°С. Компанія: «Конгур» (Україна) [66]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник Roen Est дворядний 90-50. Призначений для нагрівання й охолодження повітря в системах повітряного опалення, вентиляції та кондиціонування повітря. Витрата повітря: 5 850 м ³ /год. Гідравлічний опір: 17,44 кПа. Максимально допустимий тиск: 1,6 МПа. Компанія: «Roen Est» (Італія) [65]

НУХТ 04.02.24. КР ПЗ

Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата	Розділ 6. Специфікація обладнання		
Розроб.	Борова М.О.						
Перевір.	Старовойтова С.О.				Кафедра БТМ		
Консульт.							
Н. контр.							
Зав.кафедр.	Стабніков В.П.						
					Літера	Аркуш	Аркушів
						58	123

Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Фільтр повітряний касетний. Клас очищення F7. Площа фільтроматеріалу 18 м ² . Продуктивність 3400 м ³ /год. Ступінь очищення до 95%. Компанія: «ВЕНТ-ФІЛЬТР» (Україна) [67]
Д-8 Д-11 Д-16 Д-19	Дозатор ваговий	4	Напівавтоматичний ваговий дозатор. Дози від 0,1 до 100 г. Похибка 0-0,3 г (залежить від матеріалу). Компанія: «Suthar Pack Tech» (Індія) [68]
Р-9 Р-12	Реактор 5 л	2	Реактор РП-5 об'ємом 5 л. Швидкість роботи якірної мішалки від 0 до 60 об/хв. Обладнаний термоізолюючою сорочкою. Матеріал: сталь AISI 316 L (03X17H9M2), сталь AISI 304 (07X17H9). Розміри 400х330х900 мм. Компанія: «Промвіт» (Україна) [58]
Н-10 Н-13 Н-18 Н-21 Н-24	Насос	5	Перистальтичний шланговий насос ВНЗ-V. Продуктивність: 100 л/год. Тиск: 1,5 бар. Регулювання продуктивності: 10-100%. Компанія: «ETATRON D.S.» (Україна) [69]
ІФ-14 ІФ-22	Індивідуальний фільтр	2	Фільтр тонкого очищення ДК-350/Д-23. Продуктивність 3400 м ³ /год. Ступінь очищення 99,99 %. Початковий опір 550 Па. Компанія: «Интерхолод» (Україна) [70]
ІН-15	Інокулятор 10 л	1	Ферментер Biostat® Cplus об'ємом 10л. Матеріал нержавіюча сталь AISI 304, 316L. Швидкість обертів мішалки 20–1500 об/хв. Встановлені датчики контролю рН, температури, розчиненого кисню. Співвідношення висота-ширина 2:1. Компанія: «САРТОКАРАТ» (Україна) [57]
Р-17 Р-20	Реактор 50 л	2	Реактор РГС 50 л GMP. Матеріал сталь AISI 316 L, сталь AISI 304. Наявний перемішуючий пристрій. Довжина 900 мм, ширина 1156 мм, висота 1510 мм. Компанія: «Промвіт» (Україна) [59]
ФР-23	Ферментер 100 л	1	Реактор-ферментер РФ-100 для біологічних препаратів. Апарат оснащено манометром, барботером, датчиками контролю. Швидкість роботи мішалки від 200 до 400 об/хв. Довжина 1300 мм, ширина 700 мм, висота 1600 мм. Компанія: «Промвіт» (Україна) [45]

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми

Технологічна схема біосинтезу *Bacillus clausii* включає в себе допоміжні роботи (приготування 6% розчину HCl, приготування та стерилізація 6% розчину NaOH, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту).

Перед використання повітря для ферментації біологічного агенту, воно проходить повну очистку та стерилізацію для попередження контамінації. Стерилізація виробничого обладнання відбувається шляхом подачі пари через барботер.

ДР 1. Санітарно-гігієнічна підготовка виробництва

ДР 1.1. Приготування дезінфікуючих розчинів

Дезінфікуючі розчини готуються згідно інструкції. Для безпечної роботи розчини готуються у витяжній вентиляції з одягнутими гумовими рукавичками, захисними окулярами, респіраторами і у гумовому фартуху. Після приготування на кожну з ємностей з дезінфікуючими розчинами рекомендується закріплювати етикетку встановленого зразку з указаним найменуванням дезрозчину і його концентрації, дати приготування, умов і терміну придатності, прізвища і підпису особи, яка приготувала розчин.

ДР 1.1.1 Приготування 0,15% розчину «Дезосепт Форте»

Для обробки поверхонь, стелі, підлоги та стін готують розчин «Дезосепт Форте», що має робочу концентрацію 0,15%. Для приготування робочого дезінфікованого розчину у чистій емальованій посудині об'ємом 2 л окремо розчинюють у 1 л води 15 мл концентрованого препарату «Дезосепт Форте», перемішують 1-2 хвилини згідно інструкції. Розчин подається до ДР 1.2.

ДР 1.1.2. Приготування 1% розчину «КлінДез 401»

Для попередження стійких форм мікроорганізмів «Дезосепт Форте» чергується з «КлінДез 401». 1% розчин готується у чистому емальованому резервуарі об'ємом 2 л.

					НУХТ 04.02.24. КР ПЗ						
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата	Розділ 7. Опис технологічної схеми			Літера	Аркуш	Аркушів	
Розроб.		Борова М.О.									
Перевір.		Старовойтова С.О.							60	123	
Консульт.								Кафедра БТМ			
Н. контр.											
Зав.кафедр.		Стадніков В.П.									
					60						

Додається 990 мл води та 10 мл концентрованого «КлінДез 401», перемішується. Далі розчин подається до стадії ДР 1.2.

ДР 1.1.3. Приготування 0,5% розчину «Біомой»

Для миття обладнання чергуються «Біомой» та «Хлорантоїн».

Рекомендована концентрація розчину «Біомой» для обробки обладнання та комунікацій становить 0,5%. На технічних вагах зважують 5 г «Біомою» та готують розчин у тарі об'ємом 2л шляхом розчинення у 995 мл води. Розчин подається до ДР 1.3.1.

ДР 1.1.4 Приготування 0,5% розчину «Хлорантоїн»

Для приготування 0,5% розчину «Хлорантоїну» на технічних вагах відбирають 5 г засобу, наважку перемішують у емальованій ємності об'ємом 2 л з додаванням 995 мл води. Передають до ДР 1.3.1.

ДР 1.2. Підготовка виробничого приміщення

ДР 1.2.1 Щоденне прибирання

Прибирання проводиться після кожної зміни вологим способом. Обробку стін, підлоги та поверхонь здійснюють попередньо приготованим розчином «Дезосепт Форте» у концентрації 0,15% від ДР 1.1.1. Кожні 2 місяці замінюючи його 1% розчином «КлінДез 401» від ДР 1.1.2 для запобігання резистентності. Прибирають у гумових рукавичках, спеціальних чоботах та фартусі. Після закінчення вологого прибирання рекомендується використовувати бактерицидні лампи на 2 години для знезараження повітря, за 30 хвилин до початку роботи їх виключають. Відпрацьовані розчини направляються до стадії ЗВ 8.3.

ДР 1.2.2 Генеральне прибирання виробничих приміщень

Генеральне прибирання здійснюється раз на 30 днів з обробкою стін, що за 126 цикли виробничого біосинтезу буде складати 4 рази. Процес включає в себе миття та дезінфекцію всіх поверхонь, дверей, вікон, стін та підлоги розчинами миючих засобів та додаткове промивання гарячою водою з дотриманням правил безпеки.

Рідкі відходи після прибирання передаються до ЗВ 8.3.

ДР 1.3. Підготовка обладнання та комунікації

ДР 1.3.1. Миття та дезінфекція технологічного обладнання та комунікацій

Підготовка обладнання здійснюється перед та після технологічного процесу. Підготовка обладнання складається з ретельної очистки, миття та дезінфекції внутрішніх та зовнішніх поверхонь всього технологічного обладнання миючими та дезінфікуючими засобами. Після дезобробки обладнання не повинно містити життєздатних мікроорганізмів.

Миття та дезінфекція здійснюється попередньо підготовленим розчином «Біомой» (від ДР 1.1.3) або «Хлорантоін» (від ДР1.1.4) , які чергуються між собою. Процес проходить у системі автоматичної мийки СІР з великою кількістю форсунок протягом 15 хвилин за температури 70 - 80°C. Цей етап допомагає видалити білково-жирові забруднення різного походження. Після миття обладнання ополіскується водою протягом 20 хв для того, щоб прибрати залишки дезінфікуючих засобів.

Використані рідкі відходи направляються на ЗВ 8.3.

ДР 1.3.2. Технічний огляд

Технічний огляд здійснюють з метою виявлення ущільнень, вм'ятин та інших пошкоджень обладнання, що можуть негативно вплинути на виробничі процеси. Всі несправності усуваються інженерами на виробництві.

ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність

У апарати подається стиснене повітря з тиском 0,2 МПа протягом 30 хв. Контролюючи значення тиску виявляють чи обладнання герметичне. Фланцеві з'єднання у комунікаціях перевіряються шляхом подачі мильної води.

За наявності пропусків їх усувають та повторюють процес перевірки.

ДР 1.3.4 Стерилізація обладнання та комунікацій

Для проведення стерилізації в сорочку апарата подається гостра пара та прогріває апарат до температури 80°C. Відкривають усю запірну арматуру та подають пару в апарат через нижній спуск, відкриваючи вентиль для виходу відпрацьованого повітря. Температура стерилізації становить 131°C, після її досягнення, арматуру крім парової закривають та залишають на стерилізацію на 60 хв.

По закінченню процесу арматура закривається, а апарат оброблюється стерильним повітрям та сорочка холодною водою до досягнення температури 30-40°C. Безпосередньо перед початком технологічного процесу обладнання

промивається водою для ін'єкцій. До того ж після кожної операції обладнання очищується і забезпечується ідентифікаційними картками.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря та механічна очистка

Забір атмосферного повітря здійснюється за допомогою повітрозабірника (ПЗ-1) через забірну шахту на висоті 20-30 м. Під дією сил повітря направляється до фільтру грубого очищення (Ф-2).

ДР 2.2 Очищення повітря від пилу та грубих часточок на фільтрі грубого очищення

Очистку від механічних домішок проводять шляхом фільтрації за допомогою фільтру грубого очищення (Ф-2) (DustFilter E100 від компанії «GrowPro», Україна), що затримує частинки розміром >10 мкм. Ступінь очищення повітря після проходження через даний фільтр досягає 80%.

ДР 2.3 Стиснення повітря компресором

Стиснення здійснюють двоступінчастим компресором (К-3) з ремінною передачею з максимальним тиском 10 бар, що призводить до нагрівання повітря до 200°C.

ДР 2.4 Охолодження та видалення вологи

В теплообміннику-охолоджувачі (Т-4) повітря охолоджують до 25-30°C. Процес забезпечує випадання вологи. Відносна вологість повітря не повинна перевищувати 60%.

ДР 2.5 Нагрівання повітря

Для забезпечення роботи головного та індивідуальних фільтрів повітря нагрівають до температури вищої, ніж температура культивування, що становить приблизно 40°C за допомогою теплообмінника-нагрівача (Т-6).

ДР 2.6 Очищення на головному фільтрі

Ступінь очищення на головному фільтрі (Ф-7) становить до 95%, відбувається очищення від частинок менше 5 мкм. Звідси повітря подається на індивідуальні фільтри.

ДР 2.7 Очищення повітря за допомогою індивідуальних фільтрів

Індивідуальні фільтри (ІФ-14, ІФ-22), що встановлено на інокуляторі та ферментері, затримують часточки до 1,5 мкм і біологічні забруднення. Ступінь очищення становить 99,9999%, що вказує на стерильність аераційного повітря. Після проведення процесу очищення аераційного повітря проводять стерилізацію фільтруючого матеріалу шляхом висушування гарячим повітрям.

ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 3.1. Приготування 6%-го розчину соляної кислоти для підкислення середовища для інокулятора об'ємом 10 л

Для отримання 6%-го розчину соляної кислоти для поживного середовища об'ємом 6 л необхідно підготувати титрувальний розчин, об'єм якого складає 0,2% об'єму культуральної рідини, що становить 12 мл титрувального розчину. Для цього мірною піпеткою з грушею відбирають 0,7 мл концентрованої 36% HCl змішують з 11,3 мл водопровідної води. У колбу об'ємом 100 мл додають 11,3 мл дистильованої води за допомогою мірного циліндра об'ємом 25 мл, далі вносять визначені об'єми кислоти піпеткою з грушею та закривають ватно-марлевою пробкою, перемішують. Розчин передають до ДР 5.2.2, у збірнику проводять стерилізацію за температури 131°C під тиском 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ДР 3.2. Приготування 6%-го розчину соляної кислоти для підкислення середовища для ферментера об'ємом 100 л

Для приготування 6%-го розчину соляної кислоти для поживного середовища об'ємом 60,6 л необхідно підготувати об'єм близько 120 мл. Для цього у колбу об'ємом 200 мл додають 113 мл дистильованої води за допомогою мірного циліндра об'ємом 200 мл, мірним циліндром відміряють 7 мл концентрованої 36% HCl, вносять до колби з водою. Компоненти перемішують. Передають до ДР 5.2.3 після стерилізації, яку проводять у колбі за температури 131°C під тиском 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію для підлучення поживного середовища для інокулятора об'ємом 10 л

Для приготування 12 мл 6% розчину натрій гідроксиду для підлучення 6 л середовища, необхідно взяти 0,7 г кристалічного NaOH та 11,3 мл дистильованої

води. На технічних вагах зважують 0,7 г NaOH та додають у колбу об'ємом 100 мл, додають 11,3 мл дистильованої води використовуючи мірний циліндр об'ємом 25 мл і перемішують. Стерилізують безпосередньо у збірнику за температури 131°C під тиском 0,15 МПа упродовж 40 хв. Проводять мікробіологічний контроль. Передають до ТП 6.5.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію для підлучення поживного середовища для ферментера об'ємом 100 л

Для приготування 120 мл 6% розчину натрій гідроксиду для підлучення середовища об'ємом 60,6 л, необхідно взяти 7 г кристалічного NaOH та 113 мл дистильованої води.

На технічних вагах зважують 7 г NaOH та додають у колбу об'ємом 200 мл, відміряють мірним циліндром об'ємом 200 мл 113 мл дистильованої води, заливають в колбу і ретельно перемішують. Колбу закривають ватно-марлевим корком. Стерилізацію проводять в ферментері за температури 131°C під тиском 0,15 МПа упродовж 40 хв. Проводять мікробіологічний контроль. Розчин передається до ТП 7.1

ДР 4. Стерилізація емульсії піногасника

ДР 4.1 Стерилізація піногасника через лабораторний фільтр

Підготовку піногасника здійснюють шляхом його стерилізації для подальшого додавання у середовище в процесі ферментації. Так як силіконовий піногасник SILFOAM® SE 47 являє собою масляну емульсію низької в'язкості, стерилізацію краще провести шляхом використання фільтра з мембраною 0,2 мкм і подальшим додаванням в інокулятор.

У стерильну колбу на 1 л в асептичних умовах в ламінарному боксі фільтрують 550 мл піногасника через лабораторний фільтр з розміром пор 0,22 мкм. Після цього колбу закривають стерильною кришкою. Готовий стерильний розчин піногасника подають із забезпеченням умов асептики на стадії ТП 6.5 та ТП 7.1 в об'ємі 50 мл та 500 мл відповідно.

ДР 5. Приготування і стерилізація поживних середовищ

Визначено, що найвища концентрація біомаси *Bacillus clausii* (8,3 г/л) досягається, за умов росту протягом 34 годин на середовищі наступного складу:

глюкоза – 10; дріжджовий екстракт – 7; KNO_3 - 5,8; K_2HPO_4 - 4; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ - 4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; CaCl_2 – 0,002; Na_2CO_3 – 10; 1% розчин солей, що містить (г/л): $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ - 10; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ – 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; ZnCl_2 – 0,2 [13]. Компоненти об'єднують у композиції та стерилізують згідно визначених умов.

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

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування поживного середовища об'ємом 660 мл для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у *табл.7.1*:

Таблиця 7.1

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,66 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	10	5	А	0,15
Дріжджовий екстракт	7	3,5		
Вода		150 мл		
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	4	2	Б	0,25
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	0,25		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2	1		
Na_2CO_3	10	5		
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	10	5		
Вода		250 мл		
KNO_3	5,8	2,9	В	0,1
K_2HPO_4	4	2		
Вода		100 мл		
CaCl_2	0,002	0,001	Г	0,1
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,1	0,05		
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,2	0,1		
ZnCl_2	0,2	0,1		
Вода		100 мл		
Всього				0,6 л

ДР 5.1.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 5 г глюкози та 3,5 г дріжджового екстракту, переносять в колбу об'ємом 1000 мл, мірним циліндром об'ємом 250 мл відміряють 150 мл водопровідної води, додають у колбу та перемішують. Стерилізацію

проводять в автоклаві за температури 120°C, 0,05 МПа протягом 20 хвилин попередньо закривши колбу ватно-марлевою пробкою. Проводиться мікробіологічний контроль. Розчин передають на ТП 6.4.

ДР 5.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 2 г $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 0,25 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 г Na_2CO_3 та 5 г $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ і переносять у колбу об'ємом 500 мл, за допомогою мірного циліндра об'ємом 500 мл відміряють 250 мл водопровідної води, додають до компонентів і перемішують. Колбу закривають ватно-марлевим корком та стерилізують в автоклаві за температури 131°C, 0,15 МПа 40 хв. Проводиться мікробіологічний контроль на відсутність контамінації. Композиція передається до ТП 6.4.

ДР 5.1.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 2,9 г KNO_3 та 2 г K_2HPO_4 і переносяться у колбу об'ємом 200 мл, додаючи 100 мл водопровідної води, використовуючи мірний циліндр об'ємом 100 мл, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 40 хв за температури 131°C, 0,15 МПа. Проводять мікробіологічний контроль. Розчин передається до ТП 6.4.

ДР 5.1.4 Приготування та стерилізація композиції Г

Для зручності зважування солей запасний розчин готують об'ємом 100 мл із концентрацією збільшеною у 100 разів. Тоді для 0,6 л поживного середовища для колб на качалках потрібно 1 мл об'єму концентрованого запасного розчину солей. На технічних вагах зважують 0,1 г CaCl_2 , 5 г $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 10 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ і 10 г ZnCl_2 . Наважку переносять у колбу на 250 мл та додають 100 мл водопровідної води за допомогою мірного циліндра об'ємом 150 мл. Перемішують та колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізацію проводять в автоклаві за температури 131°C, тиску 0,15 МПа 40 хв. Проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти. Композицію передають до ТП 6.4.

ДР 5.2 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

Для одержання посівного матеріалу необхідно підготувати 6 л поживного середовища. Для цього потрібно розрахувати вміст компонентів для приготування композицій та врахувати об'єм конденсату, що становить 10% від об'єму. Загалом об'єм води для приготування середовища становить 5,9 л (з урахуванням конденсату) (табл.7.2).

Таблиця 7.2

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в посівних апаратах об'ємом 10 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	10	50	А	2
Дріжджовий екстракт	7	35		
Вода		1800 мл		
Конденсат		200 мл		
KNO ₃	5,8	29	Б	3,9
K ₂ HPO ₄	4	20		
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	4	20		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5	2,5		
CaCl ₂	0,002	0,01		
Na ₂ CO ₃	10	50		
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	10	50		
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,1	0,4		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2	10		
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,2	1		
ZnCl ₂	0,2	1		
Вода		3640 мл		
Конденсат		360 мл		
Всього				

ДР 5.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

Ваговим дозатором (Д-8) зважують 50 г глюкози та 35 г дріжджового екстракту, поміщають у реактор об'ємом 5 л (Р-9) та додають за допомогою лічильника 1800 мл водопровідної води (враховуючи 10% конденсату від робочого об'єму апарату). Парою, яку подають в сорочку апарату, нагрівають компоненти для кращого розчинення та вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізацію проводять у збірнику

під тиском 0,15 МПа при температурі 112°C упродовж 30 хв. Проводять мікробіологічний контроль. Розчин передають до ТП 6.5.

ДР 5.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

За допомогою вагового дозатора (Д-11) зважують 29 г KNO_3 , 20 г K_2HPO_4 , 20 г $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 2,5 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 г CaCl_2 , 50 г Na_2CO_3 , 50 г $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 0,5 г $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 10 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 г ZnCl_2 . Для попередження випадіння осаду солей кальцію та магнію, додають підготований титруючий 6%-ий розчин HCl в об'ємі 12 мл (від ДР 3.1). Наважку переміщують у реактор об'ємом 5 л (Р-12) та додають, відмірюючи лічильником 3640 мл водопровідної води (враховуючи 10% конденсату від робочого об'єму апарату). Для розчинення компонентів подачею пари у сорочку апарату нагрівають розчин до 40°C та вмикають перемішувач. Композицію стерилізують в інокуляторі об'ємом 10 л за температури 131°C, тиску 0,15 МПа 40 хв. Проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти. Отриманий розчин передають на ТП 6.5.

ДР 5.3 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 100 л

Для приготування 59 л поживного середовища необхідний розрахунок компонентів наведений у табл.7.3:

Таблиця 7.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 100 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 60,6 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	10	500	А	20
Дріжджовий екстракт	7	350		
Вода		18000 мл		
Конденсат		2000 мл		
KNO_3	5,8	290	Б	39
K_2HPO_4	4	200		
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	4	200		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	25		
CaCl_2	0,002	0,1		
Na_2CO_3	10	500		

Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	10	500	Б	39
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,1	5		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2	100		
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,2	10		
ZnCl ₂	0,2	10		
Вода		35500 мл		
Конденсат		3500 мл		
Всего				

ДР 5.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

Використовуючи ваговий дозатор (Д-16) зважують 500 г глюкози та 350 г дріжджового екстракту. Отриману наважку переносять у реактор об'ємом 50 л (Р-20) та, за допомогою автоматизованого лічильника, додають 18000 мл водопровідної води (враховуючи 10% конденсату від робочого об'єму апарату). Парою, що подають у сорочку апарату, нагрівають компоненти для кращого розчинення та вмикають перемішувач. Стерилізацію проводять у збірнику під тиском 0,15 МПа при температурі 112°C упродовж 30 хв. Проводять мікробіологічний контроль на відсутність контамінації. Розчин передають на ТП 7.1.

ДР 5.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Ваговим дозатором (Д-19) зважують 290 г KNO_3 , 200 г K_2HPO_4 , 200 г $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 25 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 г CaCl_2 , 500 г Na_2CO_3 , 500 г $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 5 г $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 100 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 г ZnCl_2 . Наважку перемішують у реактор об'ємом 50 л, додають 6%-ий розчин HCl в об'ємі 120 мл в якості титруючого агенту (від ДР 2.2) та за допомогою лічильника додають 35500 мл водопровідної води, попередньо визначивши 10% конденсату, який залежить від робочого об'єму апарату. Для розчинення компонентів подають пару в сорочку апарату, нагріваючи розчин до 40°C, і вмикають перемішувач. Стерилізацію композиції проводять безпосередньо в ферментері за температури 131°C, тиску 0,15 МПа 40 хв. Проводиться мікробіологічний контроль. Розчин передається до ТП 7.1.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1 Активація колекційної культури

Колекційну культуру *Bacillus clausii* зберігають на живильному агаризованому середовищі з МПА за температури 2 – 8°C. Для збереження фізіолого-біохімічних властивостей штаму, пересіви здійснюють не рідше 1 разу на рік (через 3-4 місяці). Всі маніпуляції з колекційною культурою слід проводити в асептичних умов для запобігання ризику контамінації. Перевірку чистоти культури здійснюють шляхом проведення мікробіологічного контролю [71].

ТП 6.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Отриману колекційну культуру *Bacillus clausii* (від ТП 6.1), що зберігається на середовищі з МПА, пересівають у чашку Петрі з агаризованим середовищем МПА, що має рівень рН 8,0. Інкують за температури 30°C протягом 24-48 год. Після інкубування проводять мікроскопічний та мікробіологічний контроль. Після виявлення росту, відбувається вирощування робочої культури [72]. Одержана культура передається до ТП 6.3.

ТП 6.3 Вирощування посівного матеріалу

В пробірки з агаризованим середовищем МПА у асептичних умовах за допомогою мікробіологічної петлі пересівають отримані ізольовані колонії *Bacillus clausii* (від ТП 6.2), що знаходяться на відстані не менше 1 см, в окрему пробірку засівається одна ізольована колонія. Тривалість вирощування 24 год за температури 30-35°C. Проводять мікроскопічний та мікробіологічний контроль на відсутність контамінації. Отримана робоча культура передається до ТП 6.4.

ТП 6.4. Вирощування культури у колбах на качалці

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 1 л зі 150 мл композиції А (від ДР 5.1.1), з простерилізованих композицій вносять 250 мл розчину композиції Б (від ДР 5.1.2), 100 мл композиції В (від ДР 5.1.3) та, виходячи з концентрації солей, 1 мл запасного розчину солей (композиція Г) (від ДР 5.1.4). Внесення проводять в асептичних умовах для запобігання контамінації. Середовище перемішують та розливають по 250 мл у чотири простерилізовані колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з отриманою робочою культурою (від ТП 6.3), вирощеною на МПА, вносять 5 мл дистильованої води та за допомогою петлі суспендують і, в асептичних

умовах, піпеткою вносять у колбу з приготованим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактерії, одержані з однієї пробірки. Об'єм посівного матеріалу становить 0,06 л. Мікроорганізми вирощують у колбах на качалці впродовж 48 годин за температури 35°C та швидкості перемішування 300 об/хв [13]. З колб відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю на відсутність сторонньої мікробіоти та наявності робочої культури. Передають на стадію ТП 6.5.

ТП 6.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

До інокулятора об'ємом 10 л (ІН-15), що містить стерильну композицію Б (від ДР 5.2.2) об'ємом 4000 мл в асептичних умовах додають 12 мл 6%-го розчину NaOH (від ДР 3.3) для доведення рН розчину до 7,0-7,5. Вносять 2000 мл стерильної композиції А (від ДР 5.2.1) перистальтичним насосом (Н-18). З засівної колби, в яку зливають інокулят з качалочних колб, і засівають 600 мл посівного матеріалу (від ТП 6.4) через факел в асептичних умовах та вмикають перемішуючий пристрій, аерацію (від ДР 2.7) та в рубашку інокулятора подають пару. Вирощують посівний матеріал за температури 35°C протягом 24 год за швидкості перемішування 400 об/хв. Піногасник (від ДР 4.1) під час технологічного процесу додають за потреби в розрахунку 0,01 від загального об'єму поживного середовища, що у даному випадку буде становити 50 мл. Піногасник додають в асептичних умовах стерильним мірним циліндром.

З інокулятора кожні 8 год відбирають проби і проводять аналіз вмісту вуглецю, азоту та аналіз мікробіологічної чистоти. Далі отриману культуральну рідину перекачують в ферментер об'ємом 100 л до ТП 7.1.

ТП 7. Біосинтез

ТП 7.1 Виробниче культивування

Культивування проводять у ферментаторі об'ємом 100 л (ФР-23). У попередньо простерилізований ферментатор разом з композицією Б (від ДР 5.3.2) з об'ємом 40 л перистальтичним насосом (Н-21) вносять 20,6 л композиції А в асептичних умовах (від ДР 5.3.1). Додають 120 мл титруючого агенту (від ДР 3.4) – 6%-го розчину NaOH, щоб довести рН середовища до 7,0-7,5. За допомогою труби перетискання в асептичних умовах вносять 6 л посівного матеріалу (від ТП 6.5) у ферментер з

доданими композиціями та вмикають турбінну мішалку, якою обладнано ферментер. Додатково підключають аерацію (від ДР 2.6) та подачу пари для нагрівання середовища. Швидкість перемішування становить 400 об/хв, культивування проводять протягом 34 годин за температури 35°C. Піногасник (від ДР 4.2) за необхідності вноситься в об'ємі 500 мл для кращого протікання процесу культивування за допомогою стерильного мірного циліндра в асептичних умовах.

Проби для проведення аналізу вмісту вуглецю, азоту, концентрації біомаси та мікробіологічної чистоти відбирають кожні 8 годин.

Процес культивування вважають закінченим, коли концентрація біомаси становить 8,3 г/л.

ЗВ 8. Знешкодження відходів

Після проведення культивування важливо проводити знешкодження аераційного повітря, води та дезінфікуючих засобів.

ЗВ 8.1. Знешкодження газоподібних відходів

Газоподібні відходи знешкоджують шляхом використання фільтрів тонкої очистки. Проводять попереднє охолодження та зниження рівня вологи у вологовідбійниках. По закінченню процесу фільтри нагрівають, щоб уникнути їх намокання.

ЗВ 8.2. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи з виробничого процесу такі, як клітини продуценту на фільтрах піддають спеціальній обробці у автоклаві. Для знешкодження непридатних реактивів передбачається окреме безпечне зберігання та передача їх до спеціальних організацій. Пакувальні матеріали, скло та інші відходи, що належать до вторсировини збираються в окремі контейнери за призначенням та в подальшому передаються до пунктів вторпереробки.

ЗВ 8.3. Знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи з виробництва пропускають через фільтри 4-х етапної комплексної очистки. Відфільтрована вода виливається в каналізаційну мережу.

РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва

8.1. Карта постадійного контролю

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю біосинтезу *Bacillus clausii* для отримання біомаси як основи пробіотика Ентерожерміна

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Методи (засоби) контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
ДР 1.1.1. Приготування 0,15% розчину «Дезосепт Форте» К _х , К _т	Концентрація розчину	Згідно інструкції	Після приготування розчину	C = 0,15%
ДР 1.1.2. Приготування 1% розчину «КлінДез 401» К _х , К _т	Концентрація розчину	Згідно інструкції	Після приготування розчину	C = 1%
ДР 1.1.3. Приготування 0,5% розчину «Біомой» К _х , К _т	Концентрація розчину	Згідно інструкції	Після приготування розчину	C = 0,5%
ДР 1.1.4 Приготування 0,5% розчину «Хлорантоін» К _х , К _т	Концентрація розчину	Згідно інструкції	Після приготування розчину	C = 0,5%
ДР 1.2.1 Щоденне прибирання К _м , К _т , К _х	Підлога Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль Хімічний контроль Технологічний контроль	Після здійснення прибирання	КУО < 800/см ²
ДР 1.2.2 Генеральне прибирання виробничих приміщень К _м , К _т , К _х	Підлога, стіни, двері, вікна Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль Хімічний контроль Технологічний контроль	Після здійснення прибирання	КУО < 300/см ²

					НУХТ 04.02.24. КР ПЗ									
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата										
Розроб.	Борова М.О.				Розділ 8. Контроль виробництва					Літера	Аркуш	Аркушів		
Перевір.	Старовойтова С.О.											74	123	
Консульт.										Кафедра БТМ				
Н. контр.														
Зав.кафедр.	Стадніков В.П.													

ДР 1.3.1. Миття та дезінфекція технологічного обладнання та комунікацій К _т	Обладнання та комунікації Температура Час	Термометр, годинник	Напротязі миття	t = 70-80°C T = 15 хв
ДР 1.3.2. Технічний огляд К _т	Обладнання та комунікації	Візуально	Після завершення миття	Відсутність ущільнень, вм'ятин та пошкоджень
ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність К _т	Обладнання та комунікації Тиск, час	Манометр, годинник	Під час перевірки	P = 0,2 МПа T = 30 хв
ДР 1.3.4 Стерилізація обладнання та комунікацій К _т , К _м	Обладнання та комунікації Температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура протягом процесу	t = 131°C T = 60 хв відсутність мікробіоти
ДР 2.1. Забір атмосферного повітря та механічна очистка К _т	Тиск	Згідно з паспортом	Підготовка повітря для проходження через фільтр грубого очищення	H = 20-30 м
ДР 2.2. Очищення повітря від пилу та грубих часточок на фільтрі грубого очищення К _т	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, тиск	Згідно паспорту фільтра	Ступінь очищення після проходження через фільтр грубого очищення	E = 75%
ДР 2.3. Стиснення повітря компресором К _т	Стиснене повітря, тиск, температура	Згідно з паспортом фільтра	Повітря після компресування	t = 200°C, P = 0,5 МПа
ДР 2.4. Охолодження та видалення вологи К _т	Охолоджене повітря після видалення вологи	Термометр	Температура після виділення вологи	t = 25-30°C, W = 60%
ДР 2.5. Нагрівання повітря К _т	Нагріте повітря, температура	Термометр	Повітря після нагрівання для подачі у інокулятор та ферментер	t = 40°C, W = 40%

ДР 2.6. <i>Очищення на головному фільтрі</i> К _Т	Повітря після очищення на головному фільтрі, тиск, температура	Манометр, термометр, згідно паспорту фільтра	Очищене повітря в головному фільтрі	E = 95%
ДР 2.7. <i>Очищення повітря на індивідуальних фільтрах</i> К _Т	Повітря на виході з індивідуальних фільтрів, температура, тиск	Термометр, манометр, згідно паспорту фільтра	Очищення повітря в індивідуальних фільтрах	E = 99,9999%
ДР 3.1. ДР 3.2. <i>Приготування 6%-го розчину соляної кислоти для підкислення середовища</i> К _Т , К _М	Концентрація розчину HCl, час, температура	Хімічний метод, годинник, термометр	Визначення концентрації після приготування розчину	t = 131°C, τ = 40 хв, P = 0,15 МПа відсутність контамінації C = 6%
ДР 3.3. ДР 3.4. <i>Приготування та стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію для підлучення поживного середовища</i> К _Т , К _М	Тиск, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину NaOH	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Тиск під час стерилізації, мікробіологічний та хімічний контроль після стерилізації	t = 131°C, τ = 40 хв, P = 0,15 МПа відсутність контамінації C = 6%
ДР 4.1. <i>Стерилізація піногасника через лабораторний фільтр</i> К _Х , К _М	Тиск, час, стерильність	Хімічний метод	Розмір мембран фільтру, мікробіологічний та хімічний контроль після стерилізації	Лабораторний фільтр мембраною 0,22 мкм Відсутність мікробіоти
ДР 5.1.1. ДР 5.2.1. ДР 5.3.1 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i> К _Т , К _М	Композиція А, тиск, температура, час	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль, термометр	Визначення тиску під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 120°C, τ = 20 хв відсутність контамінації
ДР 5.1.2. ДР 5.2.2. ДР 5.3.2 <i>Приготування та стерилізація композиції Б</i> К _Т , К _М	Композиція Б, тиск, температура, час	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль, термометр	Визначення тиску під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131°C, τ = 40 хв відсутність контамінації

ДР 5.1.3 <i>Приготування та стерилізація композиції В</i> К _т , К _м	Композиція В, тиск, температура, час	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль, термометр	Визначення тиску під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131°C, τ = 40 хв відсутність контамінації
ДР 5.1.4 <i>Приготування та стерилізація композиції Г</i> К _т , К _м	Композиція Г, тиск, температура, час	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль, термометр	Визначення тиску під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131°C, τ = 40 хв відсутність контамінації
ТП 6.1 <i>Активация колекційної культури</i> К _т , К _м	Колекційна культура <i>Bacillus clausii</i> , тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Годинник, термометр, мікробіологічний контроль	Температура під час зберігання, мікробіологічний контроль після отримання культури	t = 2 – 8°C τ = 3 – 4 місяці відсутність контамінації
ТП 6.2. <i>Одержання робочої культури на агаризованому середовищі</i> К _т , К _м	Робоча культура <i>Bacillus clausii</i> , тривалість культивування, відсутність мікробіоти, температура	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температуру визначають під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 30°C, τ = 24-48 год, відсутність контамінації
ТП 6.3 <i>Вирощування посівного матеріалу</i> К _т , К _м	Робоча культура <i>Bacillus clausii</i> , тривалість культивування, відсутність мікробіологічного забруднення, температура	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температуру визначають під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 30°C, τ = 24-48 год, відсутність контамінації
ТП 6.4. <i>Вирощування культури у колбах на качалці</i> К _т , К _м , К _х	Посівний матеріал, рН, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура та частота обертів визначаються перед культивуванням, мікробіологічний контроль та визначення біомаси після	pH = 9,5-10 t = 35°C, n = 300 об/хв τ = 10 год, відсутність контамінації

ТП 6.5. <i>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л</i> К _т , К _м , К _х	Посівний матеріал, рН, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси	Датчик рН та температури, годинник, мікробіологічний контроль	рН визначається перед культивуванням, температура під час культивування. Проби для визначення концентрації біомаси та мікробіологічного контролю відбираються кожні 8 годин	рН = 9,5-10 t = 35°C, n = 400 об/хв τ = 34 год, відсутність контамінації X = 8,3±1 г/л
ТП 7.1 <i>Виробниче культивування</i> К _т , К _м , К _х	Культуральна рідина, рН, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси	Датчик рН та температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час культивування, рН перед культивуванням. Проби для визначення чистоти та концентрації біомаси відбираються кожні 8 годин	рН = 9,5-10 t = 35°C, n = 400 об/хв τ = 34 год, відсутність контамінації X = 8,3±1 г/л

8.2. Методики мікробіологічного контролю

8.2.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ

Мікробіологічний контроль здійснюють після стерилізації композицій, поживних середовищ, під час етапів приготування посівного матеріалу та зокрема під час біосинтезу. Існує два методи для проведення даного виду контролю: мікроскопіювання та висів культуральної рідини на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА). Про стерильність простерилізованих компонентів поживних середовищ і композицій вказує відсутність росту на тестових середовищах. Для перевірки стерильності поживних середовищ спочатку підготовлюють чашки Петрі у сухожарі. Далі розливають 20-30 мл рідкого МПА і залишають для застигання агару. Чашки витримують 2-3 доби за температури 30°C кришками донизу.

Для аналізу відсутності контамінації з пробірок з поживним середовищем відбирають 0,1 мл проби та в асептичних умовах наносять її на поверхню агару.

Розподіляють по поверхні за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Чашки з пробами обгортають у папір та переносять у термостат для інкубації за температури 30-34°C на протязі 1-2 діб. Після інкубації візуально визначають відсутність мікробіоти на поживному середовищі [72].

8.2.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури

Після культивування у культуральній рідині не повинно знаходитись контамінантів, а необхідно спостерігати лише досліджувану культуру. Колонії *Bacillus clausii* в культурах агару утворюють круглі біло-жовті матові колонії з нерівними краями діаметром близько 3-4 мм. Мають правильну форму, плоский рельєф, ущільнені в центрі, сухі і не проростають в агар (рис. 8.1.) [18].

Мікроскопію здійснюють за допомогою оптичного мікроскопу методом «роздавлена крапля», препарат готується на предметному скельці, що попередньо було знежирене. На скло наносять невелику краплю культуральної рідини, накривають покривним скельцем та досліджують під мікроскопом зі збільшенням x40 без імерсії та x90 з імерсією. Характерними ознаками клітин *Bacillus clausii* є: грампозитивна рухома аеробна непатогенна паличка з закругленими кінцями, що формує спори. Клітини спокою знаходяться усередині бактеріальної клітини не викликаючи модифікацій звичайної форми бактерій. Під мікроскопом сукупність бактеріальних клітин розташовуються разом та формують довгі ланцюги (рис. 8.1.). У клітини наявна товста клітинна стінка, що складається з пептогліканового муреїну. Розміри бактеріальної клітини складають: довжина 2-3 мікрометра, ширина 1 мікрометр [12].



а



б

Рис. 8.1. *Bacillus clausii*: а - форма клітин зафарбованих за Грамом під світловим мікроскопом, збільшення $\times 90$; б - зовнішній вигляд культури *Bacillus clausii* за росту на агаризованому середовищі [73]

8.3. Показники росту цільового продукту

8.3.1. Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси визначають використовуючи ваговий метод. Він поділяється на три етапи: попереднє визначення маси пробірок центрифуги; центрифугування культуральної рідини; визначення ваги отриманої біомаси.

В центрифужну пробірку переносять 5-20 мл ретельно перемішаної культуральної рідини, центрифугують 15-20 хвилин за 5-10 тис. об/хв. Після центрифугування рідину зливають, а осад промивають дистильованою водою з HCl (1 мл на 1 л води). Далі супернатант зливають.

Вагу біомаси визначають за формулою:

$$M = \frac{(A - B) \times 1000}{V}$$

де М – сира біомаса в г/л; А – маса центрифужної пробірки з осадом в г; В – маса центрифужної пробірки без осаду в г; V – об'єм культуральної рідини, взятий для центрифугування в мл (см³) [74].

8.3.2. Метод визначення життєздатних клітин

Культивування *Bacillus clausii* з метою отримання біомаси проводиться у асептичних умовах для запобігання контамінації, тому важливо здійснювати мікробіологічний контроль на всіх етапах культивування. Для цього з інокуляторів та ферментера кожні 8 годин відбираються проби культуральної рідини для аналізу.

Кількісний підрахунок життєздатних бактерій здійснюють методом висіву на чашках. Для ізолювання та культивування бактерій використовують такий субстрат, як серцево-мозковий агар (BHI, Oxoid, England). Для кожного окремого аналізу використовується 1 мл суспензії клітин, об'єм відбирають стерильною піпеткою, а далі змішують з 9 мл ізотонічного розчинника для максимального росту мікроорганізмів (MRD, Oxoid, England). Після проведення серії десятикратних розведень (10^6 , 10^7 , 10^8), 100 мікролітрів засіюють у чашки та інкубують в аеробних

умовах протягом 48 годин при температурі 44°C. Перед підрахунком спори зразків інактивують нагріванням при 85°C протягом 10 хвилин з метою знищення вегетативних клітин та пророслих спор, що залишилися [75].

Після всього визначають розведення, де наявний ріст колоній бактерій. Обчислюють кількість живих бактерій, помножуючи кількість колоній на рівень розведення мікробної суспензії у досліджуваній чашці за формулою:

$$x = \frac{\alpha \cdot 10^n}{v},$$

де x – кількість живих бактерій, а – середнє число колоній при висіві розведення, V - обсяг суспензії взятий для посіву, 10^n - коефіцієнт розведення

Після всього визначають розведення, де наявний ріст колоній бактерій. Обчислюють кількість живих бактерій, помножуючи кількість колоній на рівень розведення мікробної суспензії у досліджуваній чашці. Показником життєдіяльності у серії десятикратних розведень є показник росту не менше, ніж у пробірці з розведенням 1×10^9 , що дорівнює вмісту 1×10^9 живих клітин у аналізованій пробі.

8.3.3. Метод визначення кількості спор

Спороутворення є також важливим критерієм для ідентифікації. Ефективним методом виявлення спор *Bacillus clausii* є метод Ожешко [76].

Метод заснований на принципі забарвлення кислотостійких бактерій. Відмінність полягає в попередній обробці мікроорганізмів 0,5% розчином соляної кислотою, що полегшує забарвлення спор карболовим фуксином. Спори кислотостійкі, тому фарбуються в червоний колір.

Методика забарвлення по Ожешко складається з наступних етапів:

1. На висушений, незафіксований мазок наливають декілька крапель 0,5% HCL і підігрівають 2 хв. над полум'ям до кипіння. Залишок кислоти зливають, препарат охолоджують в повітрі.

2. Препарат промивають, висушують і фіксують в полум'ї.

3. Далі фарбують за методом Ціля – Нільсена.

Спори бактерій, зафарбовані цим методом набувають яскраво червоного кольору, вегетативні форми – синього або зеленого [76]. Після проявлення кольору проводять підрахунок спор.

8.3.4. Специфічна нешкідливість

Випробовування специфічної нешкідливості проводять дослідами на найпростіших тест-організмах та на лабораторних тваринах (миші).

Тест-мікроорганізмом на дослідження виступає культура *Tetrahymena pyriformis*. Пробіотичний препарат розводять з розрахунку 20 см³ препарату на 100 см³ води (проба № 1); 10 см³ на 100 см³ води (проба № 2); 5 см³ препарату на 100 см³ води (проба № 3); 1 см³ препарату на 100 см³ води (проба № 4); 0,1 см³ на 100 см³ води (проба № 5). Далі проводять облік на нешкідливість через 2, 4, 6, 24 і 96 годин. Проводять виявлення наявності або відсутності змінених форм інфузорій, характеру руху та наявності загиблих тест-організмів.

Для визначення нешкідливості на мишах проводиться примусове внутрішньошлункове введення 0,5 мл пробіотичного препарату. Далі спостережують на протязі 5 діб.

Препарат проходить перевірку, якщо клінічні спостереження не показують жодних відхилень. Дослідні миші не повинні загинути та втратити вагу, у разі виявлення даних випадків, контроль повторюють на подвійній кількості тварин.

Допустимі межі. Дослідні тест-організми та лабораторні миші не повинні загинути в результаті дослідження.

8.3.5. Антагоністична активність

Дослідження антагоністичної активності відбувається методом агарового блоку, який заключається у тому, що штам пробіотичного мікроорганізму *Bacillus clausii* засівається «газоном» в глибині агаризованого середовища MRS. Прееносять 1 мл мікробної суспензії у стерильну чашку Петрі, вноситься розплавлене поживне середовище, ретельно перемішується та залишається затвердіти на холодній горизонтальній поверхні.

Далі проводиться інкубування за 37°C протягом 72 годин. Після інкубування профламбованим скальпелем або пробійником вирізається блок з агару та

розміщується у чашці Петрі з попередньо приготованим середовищем Гаузе-2, що є придатним для зростання патогенних та умовно-патогенних культур. Радіально підсиваються тест-культури патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів та чашки інкубують за 37°C протягом 72 годин. Ступінь чутливості визначають за діаметром зон затримки росту, де 5-15 мм – малочутливість, 30-40 мм – високочутливість.

Допустимі межі. *Bacillus clausii* проявляє активність проти грампозитивних бактерій, включаючи *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* та *Clostridium difficile*.

8.3.6. Визначення стійкості пробіотичної культури до антибіотиків

Також для визначення стійкості до антибіотиків використовується метод дифузії в агар. Підготовлюється суспензія пробіотичних клітин *Bacillus clausii* та засіваються у чашки Петрі з розлитим агаризованим середовищем (бульйон Хоттингера).

На поживне середовище по периметру наносяться паперові диски у кількості 4-5 шт на поживне середовище, засіяне пробіотичною культурою *Bacillus clausii*. Для кожного випробування використовують не менше 3-х чашок. Чашки інкубують при 37°C протягом 72 годин, потім вимірюють діаметри зон затримки росту тест-мікроба, утвореними розчинами [74].

У культури *Bacillus clausii* повна стійкість визначається до дії таких антибіотиків як еритроміцин, азитроміцин, спіраміцин, лінкоміцин, кларитроміцин та метронідазол [23].

8.4. Концентрація джерела вуглецю та азоту

8.4.1. Визначення концентрації джерела вуглецевого живлення

У якості джерела вуглецевого живлення у поживному середовищі для культивування *Bacillus clausii* виступає глюкоза, для визначення використовують спектрофотометричний аналіз з використанням ферментативного набору. Для проведення аналізу концентрації спочатку відбирають 1-2 мл проби культуральної рідини та відділяють біомасу шляхом фільтрування через фільтр з розміром пор 0,22 мм або центрифугуванням при 3000-5000 об/хв протягом 5-15 хвилин та отриманий

супернатант переноситься у іншу пробірку. Зразки зберігають за низьких температур для зменшення ризику контамінації сторонніми мікроорганізмами. Визначення концентрації глюкози в поживному середовищі відбувається за допомогою ферментативного набору (GlucGDH; Roche). Його функція заснована на перетворенні глюкози в глюконат ферментом глюкозодегідрогеназа і подальшим вимірюванням утворених молекул НАДФН, перетворених з НАДФ. Дериватизацію (отримання похідних речовин аналізованої речовини, що мають більш придатні аналітичні властивості) проводять за допомогою системи оцтовий ангідрид-ацетилхлорид. Досліджуваний зразок додають у кювети та перевіряють на наявність бульбашок, за наявності, кювети струшують та постукуванням видаляють їх. До зразка додають 20 мкл суспензії ферменту, кювети закривають кришками та перемішують. Виміри проводяться при довжині хвилі 340 нм. Кінцеве поглинання повинно мати значення менше 1. Зміну абсорбції визначають шляхом віднімання початкової абсорбції від кінцевої. Отриманий результат віднімають від значення зразка, отриманого з кювети для порівняння, з водою. Значення множать на коефіцієнт розведення зразка та ділять на об'єм, поділений на 50 мкл, для отримання фінального значення абсорбції. Далі знаходять поправочний коефіцієнт шляхом ділення відомого значення досліджуваного розчину на емпіричне. Для отримання концентрації глюкози в досліджуваних зразках, значення множать на поправочний коефіцієнт. Результати вимірювань можна перевести в концентрацію глюкози за допомогою калібрувальної кривої, яка будується на основі відомих концентрацій глюкози [77].

Визначено, що за використанням глюкози як джерела вуглецю у поживному середовищі, у *Bacillus clausii* функціонує шлях Ембдена–Мейєргофа–Парнаса, пентозофосфатний цикл та цикл трикарбонових кислот в якому анаплеротичні реакції каталізує піруваткарбоксилаза.

8.4.2. Визначення концентрації джерела азотного живлення

В поживному середовищі для отримання біомаси *Bacillus clausii* в якості джерела азотного живлення використовувався калій нітрат (KNO_3) отже треба визначити нітратний азот.

Метод, описаний у статті [79], заснований на нітрозативній модифікації сульфанілової кислоти за допомогою оксиду азоту, яка реагує з дигідрохлоридом N-(1-нафтил)етилендіаміну з утворенням продукту оранжевого кольору, що поглинає довжину хвилі 496 нм. Рівні оксиду азоту визначають в культуральному середовищі з цього вимірювання абсорбції за допомогою стандартизації хемілюмінесценції.

Для визначення джерел азотного живлення використовують покритий міддю кадмієвий реагент. Для його приготування змішують 2-3 г Кадмію та 50 мл дистильованої води у колбі Ерленмейєра об'ємом 250 мл і, після видалення супернатанту, двічі промивають 50 мл 0,5%-го розчину HCl. Далі промивають 50 мл води і 50 мл 5%-го ацетату міді для створення мідного слою. Промивання ацетатом міді слід повторювати до того моменту, як розчин кадмію не залишиться синім протягом 60 сек, що вказує на насиченість міддю. Після насичення виконують чотири промивання 25 мл води. Отриманий кадмій промивають 30 мл 0,1 HCl і зберігають у даному розчині. Для ефективного перетворення нітрату в нітрит середовище доводять до рівня pH 9,0 за допомогою NaOH. Для аналізу відбирають культуральну рідину та центрифугують при 14000 об/хв протягом 2 хв. Відбирають 0,1 мл отриманого супернатанту та змішують з 0,9 мл буферного розчину для аналізу (pH 7,4), отриманий розчин переносять у кювету ємністю 1 мл та інкубують за кімнатної температури протягом 5 хв. Після інкубування додають 10 мкл 85%-го розчину фосфорної кислоти і змішують струшуванням. 0,1 мл кадмієвого реагенту змішують з 0,1 мл аналізованого зразка та перемішують за кімнатної температури. Значення абсорбції визначають при довжині хвилі 540 нм методом спектрофотометрії використовуючи скляну колонку [79].

Перерахунок кількості нітрогену з нітрату виконують з розрахунку, що азот становить трохи менше однієї чверті маси іона нітрату – 22,6% маси. Отже, якщо проба містить 100 мг нітратів, то вона містить 22,6 мг нітратного азоту.

РОЗДІЛ 9. Обґрунтування стадій виділення та очищення спор *Bacillus clausii*

Фінальним продуктом виробничого процесу є препарат, який має форму твердих желатинових капсул. Всередині капсул міститься висушена суспензія з концентрацією спор *Bacillus clausii* від 10^9 до 10^{10} КУО/г [8]. Після завершення біосинтезу концентрація спор в культуральній рідині становить 10^5 КУО/г. Готовий препарат передбачає наявність лише спор *Bacillus clausii*, а в результаті виробничої ферментації отримують культуральну рідину в якій наявні як спори так і вегетативні клітини, а також можуть знаходитись невикористані компоненти поживного середовища та продукти життєдіяльності бактерії. Тому після виробничої ферментації необхідно провести виділення та очищення цільового продукту. Технологія отримання готового препарату на основі спор *Bacillus clausii* складається з наступних етапів:

1. Виділення клітин з культуральної рідини
2. Отримання спорової суспензії
 - 2.1. Інактивація вегетативних клітин
 - 2.2. Виділення та концентрування спорової суспензії
3. Висушування спорової суспензії
4. Формування готового препарату [80]

9.1. Виділення клітин з культуральної рідини

В результаті однієї виробничої ферментації отримують культуральну рідину об'ємом 60 л в якій знаходиться велика кількість зайвих компонентів (невикористанні компоненти поживного середовища, продукти життєдіяльності бактерій) які необхідно видалити. З даною ціллю на підприємствах використовують декілька методів, а саме фільтрація, центрифугування, фільтрування, діаліз, відстоювання.

Альтернативним процесом отримання концентрату спор можна вважати розділення на кілька технологічних етапів, з використанням різних методів для відділення компонентів суспензії в культуральній рідині. Дані методи дозволяють

					НУХТ 04.02.24. КР ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата	Розділ 9. Обґрунтування стадій виділення та очищення спор <i>Bacillus clausii</i>	Літера	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Борова М.О.					86	123
Перевір.		Старовойтова С.О.				86		
Консульт.						86		
Н. контр.						Кафедра БТМ		
Зав.кафедр.		Стадніков В.П.						

відділити цільовий продукт від непотрібних елементів, але кожний з них має свої переваги та недоліки, які описано нижче.

Фільтрування - враховуючи діаметр спор (0,4 - 0,8 мкм), необхідно підібрати фільтрувальну перегородку з відповідними отворами. Однак компоненти клітин можуть забивати ці отвори, що знижує продуктивність і підвищує витрати на заміну або очищення фільтрів. До того ж, може знадобитися окреме обладнання для дезінтеграції клітин, що збільшує складність процесу.

Діаліз - процес діалізу використовує напівпроникні мембрани для розділення компонентів за розміром, але цей метод може бути повільним і вимагає спеціалізованого обладнання. Метод діалізу використовує напівпроникну мембрану для розділення фаз під тиском. Однак для промислового застосування цей метод може бути складним через наявність часток клітинних стінок і білків, які можуть накопичуватися на поверхні мембрани, знижуючи ефективність розділення. Метод може вимагати додаткового етапу очищення для видалення клітинних залишків зі спор. Крім того, можливість зворотної дифузії, спричинена поверхневою дисоціацією на мембрані, ускладнює процес розділення, що може призвести до більш складної конструкції обладнання та підвищених витрат на експлуатацію.

Відстоювання - простий метод, але може бути повільним і менш ефективним у порівнянні з іншими, особливо для великих об'ємів. Метод відстоювання базується на використанні сили тяжіння і різниці густин між компонентами. Під дією гравітації частки колоїдної системи поступово розшаровуються на окремі фази. Проте цей процес займає значний час, що робить його неефективним у промислових масштабах. Через тривалість відстоювання збільшується ризик часткової втрати життєздатності спор і контамінації сторонньою мікрофлорою. Як наслідок, можуть погіршитися біохімічні показники активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ).

Одним із найчастіше використовуваних методів для відокремлення біомаси з культуральної рідини є центрифугування – доволі швидкий та ефективний метод. В результаті дії відцентрових сил біомаса осаджується, а всі розчинені в середовищі компоненти залишаються в розчині, який в подальшому легко видаляють. До

недоліків відносять високу витрату енергії, відносно малу робочу поверхню процесу та висока вартість обладнання.

Розглянувши наведені методи виділення біомаси з культуральної рідини, можна зробити висновок що найбільш доцільним методом буде використання центрифугування, так як даний процес є швидким та дозволяє отримати біомасу з найменшими втратами під час виділення.

Враховуючи об'єм культуральної рідини який отримується в результаті виробничої ферментації доцільно обрати центрифугу PowerFuge P12 вироблену CARR Biosystems, США (рис.9.1). Дана установка має робочий об'єм барабана 8 л, але так як процес в даній установці відбувається безперервно продуктивність процесу складає 500 л/год, $60 \text{ л КР} / 500 \text{ л/год} = 7,2 \text{ хв}$, враховуючи можливі непередбачувані допоміжні стадії процес виділення біомаси з культуральної рідини займатиме максимум 15 хв, що повністю задовольняє потреби процесу, а також враховуючи велику продуктивність даної центрифуги в подальшому при масштабуванні виробництва не потрібно буде закуповувати нове обладнання [81].



Рис. 9.1. Центрифуга PowerFuge P12, виробник CARR Biosystems, США

В результаті центрифугування отримується волога біомаса з невеликим об'ємом культуральної рідини. Для отримання більш чистого продукту отриману біомасу необхідно промити деіонізованою водою, що дозволить замінити залишковий об'єм культуральної рідини на воду. Для даного процесу слід передбачити наявність збірника об'ємом 60 л в якому відбуватиметься змішування

виділеної біомаси та деіонізованої води після чого проводять повторний процес центрифугування. Дії проводять 3 рази [82].

9.2. Отримання спорової суспензії

В результаті промивання біомаси деіонізованою водою отримують відміту біомасу 3,05 кг, але отриманий продукт містить вегетативні клітини та спори. Пробіотик складається лише зі спор *Bacillus clausii*, необхідним є проведення інактивації вегетативних клітин та їх подальше видалення. Зазначається, що для видалення вегетативних клітин можна використовувати декілька методів, а саме: обробка етанолом, тепловий шок, промивання водою та використання ферментів [83].

Тепловий шок — це процедура, яка використовує екстремальні температури для знищення клітин. Основна ідея полягає в тому, щоб швидко змінювати температуру середовища, в якому перебувають клітини, з високої на низьку або навпаки. Це призводить до стресу для клітин та їх незворотного пошкодження. Однак важливо враховувати, що метод теплового шоку може мати певні обмеження і ризики. Наприклад, не всі типи клітин реагують однаково на екстремальні температури, і можуть бути клітини, що виявляють стійкість до цього методу. Отримана чистота продукту становить 67% що є найнижчим показником, а також відсоток втрат спор є дуже великим та становить 96 %

При обробці етанолом у певній концентрації відбувається ефективний лізис клітин без впливу на спори що в подальшому дозволяє осадити зруйновані клітини (ДНК та білки) в результаті реакції з етанолом. При використанні даного методу чистота продукту знаходиться на високому рівні, що становить приблизно 98 %, а втрати спор є найменшими - 60 % [83].

Промивання водою — метод є швидким і досить ефективним способом видалення зайвих речовин з культуральної рідини у лабораторних умовах. Водночас важливо враховувати, що використання промивання водою може впливати на життєздатність або функціональність досліджуваних клітин, тому необхідно дотримуватися обережності та оптимізувати умови проведення процедури відповідно

до конкретних потреб експерименту. В результаті використання даного методу чистота продукту становить 97 %, а відсоток втрат спор становить 97 %

Ферментна обробка передбачає вибір ферменту, його підготовку до використання шляхом розбавлення у буферному розчині. Клітини оброблюються розчином ферменту протягом певного часу. Під впливом ферменту клітини розриваються або розчиняються, утворюючи суспензію або дисперсію окремих клітин. Цей метод дозволяє швидко отримувати суспензії або ізольовані клітинні популяції і може бути корисним однак важливо враховувати, що деякі клітини можуть бути чутливі до ферментної обробки. Таким методом в результаті використання лізоциму чистота продукту становить 99 %, а показник втрат спор є найбільшим та становить 99 %

Розглянувши дані методи можна зробити висновок, що для інактивації вегетативних клітин оптимальним варіантом буде використання етанолу, так як при даному способі вихід спор є найбільшим - 40 %, а чистота отриманого продукту становить 98%.

Отже процес виділення спор буде полягати у тому, що відмиту біомасу поміщають в збірник в який вносять розчин етанолу та стерильної деіонізованої води у співвідношенні 1:1, в подальшому в реакторі проводять перемішування впродовж 2 год при 200 об/хв. В подальшому даний розчин центрифугують осад направляють на утилізацію, а до надосадової рідини додають деіонізовану воду та проводять центрифугування знову, повторюючи цей процес двічі.

Визначимо приблизне обладнання необхідне для даного етапу. Визначено, що процес формування спор у продуцента відбувається під час пізньої експоненційної фази та на стадії стаціонарного росту [13]. З джерела [10] визначаємо, що відсоток спор становить приблизно 80 %, тому в 3,05 кг відмитої біомаси знаходиться 2,44 кг необхідних спор. До отриманого об'єму біомаси вносять в 5,5 разів більше об'єм розчину етанолу та деіонізованої води, а саме 16,8 л.

Отже для процесу інактивації клітин необхідно передбачити наявність реактора об'ємом 25 л. Після інактивації вегетативних клітин проводять центрифугування (використовують центрифугу зазначену раніше), осад становить близько 18 л, що

утворився направляють на етап знешкодження відходів, а до надосадової рідини додають такий самий об'єм деіонізованої води (18 л). Тоді для даних процесів потрібно передбачити збірник об'ємом 60 л. В подальшому знову проводять центрифугування, видалення осаду та внесення до надосадової рідини такої ж кількості діонізованої води (18 л) та проводять повторне центрифугування.

9.3. Концентрування розчину спор

Далі буде проводитись процес сушіння, а враховуючи що отриманий об'єм розчину є великим (приблизно 51,5 л), доцільно провести концентрування розчину для подальшого пришвидшення процесу сушіння.

Одним з методів розглядається випарювання - процес концентрації розчину шляхом випаровування розчинника. Основна ідея полягає в тому, що розчинник (найчастіше вода) випаровується, залишаючи за собою більш концентрований розчин розчиненої речовини. Дозволяє швидко збільшити концентрацію речовини і є відносно простим методом, дає можливість підібрати контрольовані умови для проходження процесу. Однак, до недоліків можна віднести енергетичні затрати та найголовніший аспект – використання високих температур та складність контролю процесом, що може негативно вплинути на спори, які є основою пробіотичного препарату.

Для даного процесу оптимальним варіантом буде використання ультрафільтраційної установки з діаметром пор меншим за діаметр спор (0,4-0,8 мкм). Мембрани установки мають малий діаметр пор, що дозволяє відділяти речовини на основі їх розміру, дозволяючи пропускати лише молекули або частинки розміром нижче встановленого порогу, процес може виконуватись не використовуючи високі температури, що доцільніше при роботі зі спорами. До недоліків можна віднести ускладненість у обслуговуванні обладнання, спеціальні етапи підготовки, схильність до забруднення систем.

В результаті використання ультрафільтраційної установки отримують концентрований розчин (приблизно 15 л) який направляють в подальшому на сушіння, а фільтрат на знешкодження.

9.4. Висушування суспензії спор

Для висушування суспензії спор у промисловості рекомендується використовувати методи сублімаційного сушіння або ліофілізації, метод псевдозрідженого шару.

Сублімаційне сушіння, або ліофілізація, дозволяє випаровувати вологу при температурах нижче точки замерзання води, видаляється осмотична та капілярна волога при температурах нижче точки замерзання, що міститься в матеріалі. Тепло передається вологому матеріалу через прямий контакт або за рахунок теплового випромінювання, а видалення вологи відбувається через штучно створений перепад тисків водяної пари. Даний метод дозволяє не задавати шкоди термолабільним компонентам, якими є білки, їх біологічні процеси гальмуються без втрати активності. Ліофілізація суттєво не змінює структуру та колоїдні властивості продукту, він зберігає свої характеристики та може бути зволожений за необхідності [84,85].

До недоліки сублімаційного сушіння відносять велику тривалість в часі, складність апаратури і неможливість здійснення сушіння в безперервному потоці. Якщо сублімаційне сушіння виробляється без попереднього заморожування продукту, процес протікає в три фази: самозаморожування продукту, сублімація льоду, видалення залишкової незамерзаючої частини вологи.

Самозаморожування продукту внаслідок бурхливого випару частини вологи, що знаходиться в рідкому стані, сублімація льоду, видалення залишкової незамерзаючої частини вологи. Даний етап триває приблизно 10 хв, продукту спочатку знижується, відбувається переохолодження продукту. Далі температура стрибкоподібно підвищується унаслідок виділення теплоти кристалізації, утримуючись якийсь час на постійному рівні, після чого знову знижується. Механізм переносу вологи у фазі самозаморожування не відрізняється від переміщення при звичайному вакуумному сушінні і залежить від способу нагрівання. У цій фазі відбувається видалення 10–15% вологи з продукту. Під час цього процесу вода швидко замерзає, створюючи невеликі кристали льоду, які не призводять до суттєвого пошкодження тканин. Теплота, яка виділяється при кристалізації, використовується

для випаровування частини вологи, що зберігається в матеріалі. Однак під час самозаморожування може виникнути інтенсивне пароутворення і спінювання матеріалу. Також на якість продукту може впливати те, що процес випарювання відбувається в рідкій фазі, втрати продукту можуть сягати 20% від загального складу.

Рекомендується проводити сублімаційне сушіння після попереднього заморожування. Після завершення фази заморожування починається власне сублімація. При сублімаційному сушінні в глибокому вакуумі випаровування вологи призводить до різкого збільшення об'єму пари [84].

Проте застосування даної технології може призвести до значних втрат субстанції через високу леткість, що також може ускладнювати умови праці на виробництві. Отже, виникає потреба у підході, що мінімізує втрати компонентів продукту, раціонально використовує виробничі ресурси (такі як площа, фінанси та робочий час персоналу) і гарантує безпеку під час експлуатації.

Іншим методом для отримання висушеного продукту може слугувати псевдозріджений шар, що ґрунтується на інтенсивному перемішуванні частинок, яке досягається завдяки руху газового середовища. У процесі даного перемішування параметри шару, такі як температура, вирівнюються по всьому об'єму. Постійний рух частинок надає шару властивість текучості, що корисно для переміщення матеріалів між секціями та підтримання стабільної висоти шару. При належній організації псевдозрідженого шару в ньому відсутні застійні зони, що забезпечує добру взаємодію сорбентів з активними фармацевтичними інгредієнтами [86].

До недоліків можна віднести те, що через інтенсивне перемішування частки матеріалу можуть перебувати у шарі різний час, що призводить до нерівномірної обробки. Це може бути критично для термочутливих та інших особливих матеріалів. Також через перемішування газу з частинками матеріалу відбувається певне перемішування охолоджуючого агенту, що зменшує різницю концентрацій та інші показники, порівняно з ідеальним протипотоковим рухом. Під час сушіння в псевдозрідженому шарі може виникати стирання м'яких частинок або навіть стирання стінок обладнання, якщо працюють із твердими матеріалами.

Цей метод сушіння, разом з його різновидами, часто застосовується для організації безперервного процесу сушіння різноманітних матеріалів. Температура в псевдозрідженому шарі знаходиться в залежності від їх вологовмісту та від температури зріджуючого агенту

Метод сушіння включає такі чинники, як припущення про внутрішній тепломасоперенос, характер руху частинок, ступінь перемішування агенту сушіння та пов'язані з цим температурні співвідношення всередині шару і на виході, а також вид експериментальної кінетики та нагрівання матеріалу. Процес відбувається за режиму повного перемішування частинок матеріалу та повного витіснення агента сушіння. Це дозволяє оцінити розподіл матеріалу за вологовмістом, провести аналіз перехідних та стаціонарних режимів, і вивчити роботу багатосекційних установок [87].

Розпилювальна сушарка-гранулятор - це пристрій, що перетворює суспензії або розчини у сухі гранули без утворення пилу. Суспензію або розчин речовини розпилюють на гарячому повітрі, що призводить до одночасного висушування та формування скупчень продукту.

Видалення готових гранул може здійснюватися партіями або безперервно. У безперервному режимі продукт виводять з контрольованою швидкістю для підтримання оптимальної висоти шару. Ця технологія має низку переваг, включаючи можливість збільшення виробництва та компактність. З літературних джерел відомо [88], що для реалізації технології виробництва необхідно одержати гранули спор бацил з вологістю, що становить 2%.

Гранулометрія визначається за допомогою лазерного гранулометра у очищеній воді: 90% гранул мають розмір менше 100 мкм, а 60% гранул мають розмір менше 50 мкм, з питомою площею поверхні 3-5 м²/г.

Для досягнення таких показників при виробництві гранул використовується наступний режим роботи гранулятора-сушарки. Концентрат спор розпилюють на суміш коаліну, яка попередньо прогріта гарячим повітрям (60°C), при тиску 2 бар і зі швидкістю подачі 135 мл/хв. Система працює при температурі 60°C. Приблизно через

110 хвилин систему зупиняють та дають їй охолонути. Після цього готові гранули надсилають на наступний етап виробництва.

Згідно розглянутих методів визначено, що для отримання пробіотику на основі спор бацил обирають такі технології:

- Центрифугування для виділення з культуральної рідини, видалення домішок та концентрації;
- Пастеризація концентрату для запобігання контамінації сторонньою мікрофлорою;
- Сушіння та грануляція в псевдозрідженому шарі для створення гранул з концентрованої суспензії спор [86].

Для даного процесу необхідно передбачити збірник в якому відбуватиметься змішування сформованих наважок каоліну та мікрокристалічної целюлози та сушарку наприклад вертикальна сушарка з псевдозрідженим шаром FG-30, яка дозволяє висушувати до 100 кг продукту [89] (рис.9.2. а). Отриманий висушений продукт поміщають в бін об'ємом 70 л [90] (рис.9.2 б) та направляють на подальшу стадію.



а



б

Рис. 9.2. а - сушарка з псевдозрідженим шаром FG-30; б – бін для висушеного продукту

9.5. Формування готового препарату

Для отримання готового до реалізації продукту потрібно передбачити етап формування капсул. Враховуючи невеликий об'єм виробництва, пропонується закуповувати готові тверді желатинові капсули, що є економічно доцільніше.

Згідно патенту [80] для формування капсул використовують наступні пропорції: 0,8 частин висушеної субстанції спор, 0,19 частин мікрокристалічної целюлози та 0,01 частину стеарату магнію.

Одна капсула вміщує 0,5 г готової суміші і після сушіння спорової суспензії вага висушеної субстанції спор становить 51,2 кг, враховуючи що це 0,8 частин від усіх компонентів тоді загальна вага готового продукту становитиме:

$$M = 51,2 / 0,8 = 64 \text{ кг},$$

Тоді враховуючи загальну вагу, вага мікрокристалічної целюлози становитиме

$$64 \times 0,19 = 12,16 \text{ кг}, \text{ а стеарату магнію} - 64 \times 0,01 = 0,64 \text{ кг}.$$

Для змішування компонентів готового препарату використовують V-подібний змішувач об'ємом 100 л (рис.9.3) [91].



Рис. 9.3. V-подібний змішувач об'ємом 100 л

Після отримання об'єднаної композиції готового препарату проводять капсулювання. Для даного процесу використовують капсульну машину для наповнення NJP-1200 з продуктивністю 1200 капсул/хв (рис.9.4) [92], в результаті процес наповнення капсул триватиме до 2 год.



Рис. 9.4. Капсульна машина для наповнення NJP-1200

Заключним етапом є блітерування наповнених капсул, враховуючи наявну кількість капсул використовуватимемо автоматичну блістер для капсул DPP-250 (рис.9.5) [93], який дозволяю отримувати 9600 блістерів/год, процес блістерування триватиме близько 66 хв.



Рис. 9.5. Машина для блістерування DPP-250

На рис.9.6 представлено принципову схему стадій виробничого отримання спор *Bacillus clausii*, як основи пробіотика Ентерожерміна.

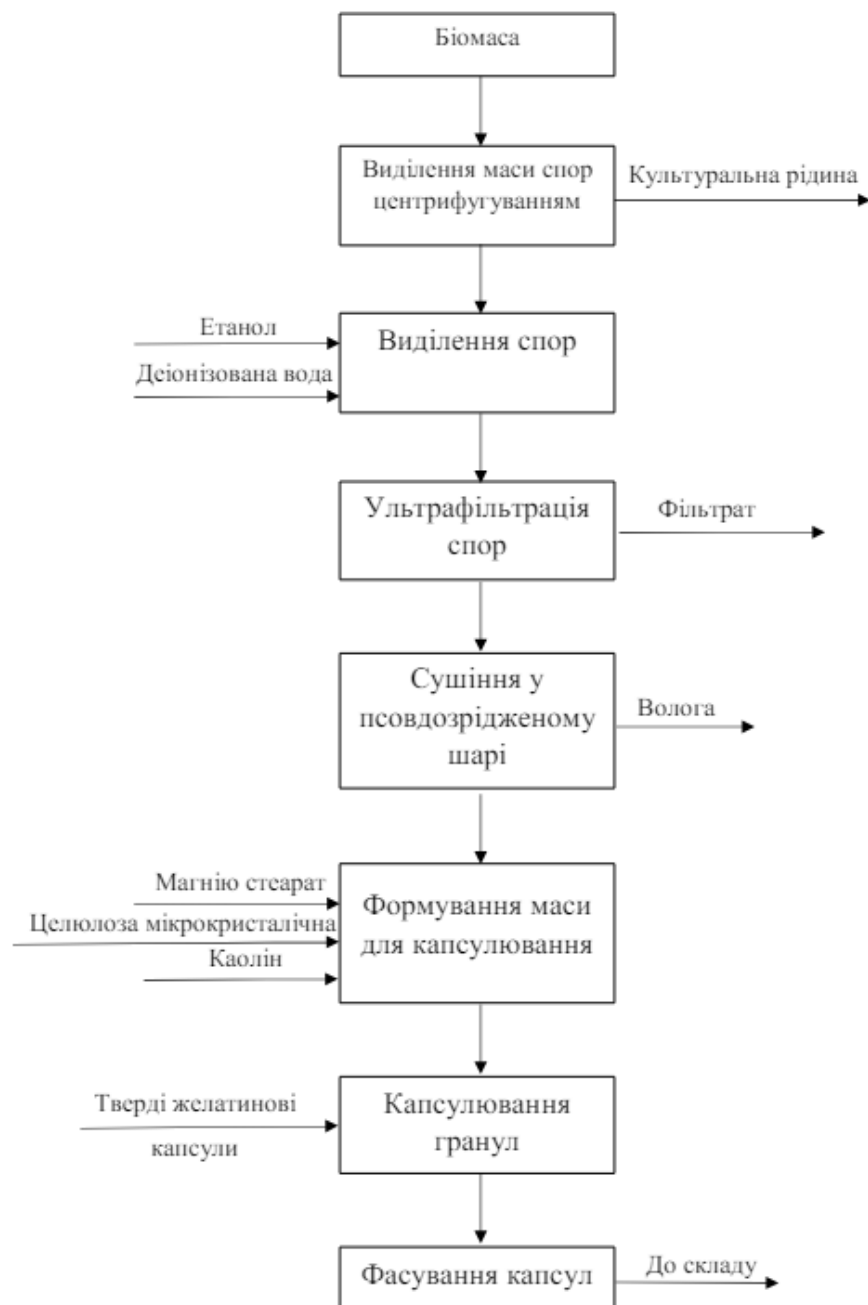


Рис. 9.6 Принципова схема післяферментаційних процесів

9.6. Матеріальні потоки та підбір обладнання

Вихідні данні

1. Об'єм культуральної рідини за один цикл ферментації - $V_{кр} = 58,41$ л;
2. Концентрація біомаси в культуральній рідині = 8,3 г/л;
3. Концентрація цільового продукту в культуральній рідині = 6,64 г/л;
4. Втрати на стадіях виділення та очищення цільового продукту складають 65% ($58,41 * 6,64 - 65 \% = 135,75$ г)

Таблиця 9.1

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні поток <i>и</i> на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати л (%)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 1 Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 1.1. Зберігання культуральної рідини	КР	58,41 л		58,41 л	Збірник об'ємом 80
ТП 2 Видалення біомаси						
2	ТП 2.1. Центрифугування	КР	58,41 л			
		Фугат	55,18 л (58,41 – 3,23)		55,18 л	На знешкодження
		Біомаса	3,23 кг (58,41 × 8,3 / 0,15 (вологість 85%))	0,08 кг (2,5 %)	3,15 кг (3,23 – 0,08)	Збірник 20 л
3	ТП 2.2. Промивання біомаси (центрифугування тричі)	Біомаса	3,15 кг			Центрифуга
		Деіонізована вода	45 л (15 л * 3 рази)			
		Фугат	45 л		45 л	
		Відмита біомаса	3,15 кг	0,032 кг (1 % за одне промивання)	3,05 кг (3,15 – 0,032*3)	
ТП 3 Отримання спорової суспензії						
4	ТП 3.1. Інактивація вегетативних клітин	Відмита біомаса	3,05 кг			Збірник 25 л
		Деіонізована вода	8,4 л			
		Етанол	8,4 л			
		Суспензія клітин	19,85 (3,05 + 8,4 + 8,4)		19,85 л	
5	ТП 3.2. Центрифугування	Суспензія клітин	19,85 л			Центрифуга
		Фугат	17,78 (19,85 – 2,07)		17,78 л	

Продовження табл. 9.1

		Осад	2,07 кг (3,05 – 0,98)		2,07 кг	Збірник 60 л
		Деіонізована вода	36 л (18 л * 2 рази)		1 л	
		Спорова суспензія	52,78 л (17,78 + 17,5 * 2)	1,32 (2,5 %)	51,46 л (52,78 + 1,32)	
	ТП 3.3. Концентрування	Спорова суспензія	51,46 л			Збірник 10 л
		Концентрована спорова суспензія	7,72 (51,46 л – 85 %)	0,38 (5 %)	7,34 л (7,72 – 0,38)	
		Пермеат			44,12 л (51,46 – 7,34)	
ТП 4 Сушіння спорової суспензії						
6	ТП 4.1. Висушування спорової суспензії	Концентрована спорова суспензія	7,34 л			Сушарка з псевдорозрідженим шаром
		Каолін	2,6 кг			
		Мікрокристалічна целюлоза	2,6 кг			
		Висушена субстанція			5,48 кг	Фармацевтичний бін 10 л
ТП 5 Об'єднання компонентів ЛЗ						
7	ТП 5.1. Змішування компонентів лікарського засобу	Висушена субстанція	5,48 кг			Змішувач сипучих речовин
		Мікрокристалічна целюлоза	1,302 кг			
		Стеарат магнію	0,068 кг			
		Об'єднана композиція ЛЗ	6,85 кг	0,06 (0,9 %)	6,79 кг (6,85 – 0,06)	Фармацевтичний бін 70 л

ТП 6 Капсулювання компонентів ЛЗ						
8	ТП 6.1. Формування капсул	Об'єднана композиція ЛЗ	6,79 кг			Напівавтоматичний капсульний наповнювач
		Желатинові капсули	13 580 шт (6,79 * 1000 / 0,5)			
		Наповнені капсули		15 шт (0,11 %)	13 565 шт (13 580 - 15)	
ПМВ 7 Пакування та маркування готового ЛЗ						
9	ТП 7.1. Фасування, пакування та маркування капсул	Наповнені капсули	13 565 шт			Лінія фасування капсул
		Фасовані капсули	1 130 блістерів (12 кап. в блістері)	2 шт (0,15 %)	1 128 блістерів (1 130 - 2)	

РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля

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

Для виявлення відходів виробництва слід проаналізувати технологічну схему згідно окремих стадій. Як рідкі відходи отримують відпрацьовані розчини миючих та дезінфікуючих засобів після обробки технологічного обладнання, стін, поверхонь, підлоги тощо. На етапі приготування та стерилізації розчинів титруючих агентів та поживного середовища утворення відходів є мінімальним. У разі їх утилізації рекомендується проводити нейтралізацію титруючих розчинів відповідним кислим або лужним розчином.

Газові відходи переважно утворюються на етапі перевірки обладнання на герметичність та стерилізації у вигляді відпрацьованого повітря, також під час процесу підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу при подачі аераційного повітря.

Тверді відходи представлені пакувальною тарою деззасобів, компонентами поживного середовища, що зберігаються у мішках.

Сучасні системи знешкодження та утилізації відходів активно використовують автоматизацію та контроль процесів, що забезпечує високу ефективність та стабільність роботи систем.

10.2. Системи знешкодження рідких відходів

Для миття та дезінфекції обладнання за допомогою СІР-мийки необхідно приготувати робочі розчини із розрахунку 20-30% від об'єму ємкісного обладнання. Відповідно до специфікації обладнання, для цього розрахунку будемо використовувати реактори-збірники, інокулятори та ферментери.

$$V_{\text{ємностей}} = V_{\text{реактор}} + V_{\text{інокулятор}} + V_{\text{реактор}} + V_{\text{інокулятор}} + V_{\text{реактор}} + V_{\text{ферментер}} = 6,6 + 10 + 66,6 + 100 = 183,2 \text{ л}$$

					НУХТ 04.02.24. КР ПЗ								
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата	Розділ 10. Охорона довкілля				Літера	Аркуш	Аркушів		
Розроб.		Борова М.О.										102	123
Перевір.		Старовойтова С.О.											
Консульт.													
Н. контр.													
Зав.кафедр.		Стадніков В.П.											
					Кафедра БТМ								

Звідси:

$$V_{\text{засобів}} = 183,2 \times 0,2 = 36,64 \text{ (37) л}$$

$$V_{\text{засобів}} = 183,2 \times 0,3 = 54,96 \text{ (55) л}$$

Припускаємо, що об'єм відпрацьованих залишків засобів дорівнює об'єму цих засобів, тобто 37 – 55 л.

Об'єм води для ополіскування, так само як і мийно-дезінфікуючого розчину, становить 20-30% від об'єму ємнісного обладнання. Згідно розрахунків, цей параметр знаходиться у межах 37 – 55 л. Таким чином, у сумі орієнтовна кількість стічних вод за один цикл виробництва становитиме: $55 + 55 = 110$ л.

Відповідно до розрахунків за один цикл отримуємо 64,9 л культуральної рідини, з концентрацією кінцевого продукту 8,3 г/л (0,0083 кг/л): $64,9 \times 0,0083 = 0,53$ кг (0,5)

Оскільки основна частина культуральної рідини є водою, то $64,9 - 0,5 = 64,4$ кг. Таким чином, за один виробничий цикл отримуємо 0,5 кг кінцевого продукту та 64,4 л води. Отже, на 1 тону готової продукції, утворюється:

$$(1000 \times 64,4)/0,5 = 128\,800 \text{ л стічних вод}$$

10.2.1. Визначення середніх витрати стічних вод від виробничого підприємства.

Для біотехнологічного виробництва з отримання біомаси, середньорічна кількість стічних вод становить – 170 л продукції [95].

Середні за зміну витрати виробничих стічних вод, визначають за формулою:

$$Q_e = q_e \times n;$$

де q_e - норма водовідведення в л на одиницю продукції, яку випускає підприємство; n - кількість одиниць продукції, що виробляється за зміну (розраховується у масових одиницях випуску готової продукції на добу). Тоді:

$$Q_e = 170 \text{ л/кг} \times 0,5 \text{ добу} \approx 86 \text{ л/доба.}$$

Середні за зміну витрати побутових стічних вод становлять:

$$Q_n = q_n \times N = 25 \times 5 = 125 \text{ л/зміну,}$$

де q_n – норма відведення побутових стічних вод в л/зм на одного робітника (приймаємо для холодного цеху 0,025 м3/зм люд); N – кількість робітників, що працюють у зміну, що приймається рівним 5:

- Особа, яка відповідає за процес культивування, збирання та очищення біомаси з ферментера, має посаду технолога цеху (біотехнолога).
- Особа відповідаюча за контроль якості на різних етапах виробництва та забезпечує виконання стандартів GMP і вимог регулюючих органів, має посаду мікробіолога ВКЯ (відповідального за контроль якості).
- Технік з обслуговування, що відповідає за обслуговування та ремонт обладнання.
- Керівник зміни - особа, яка керує роботою всіх працівників на зміні та вирішує питання, пов'язані з виробничими процесами.
- Забезпечує дотримання правил санітарної гігієни та чистоти в цеху, включаючи підготовку приміщень, дезінфекцію обладнання та контроль за особистою гігієною працівників санітарний робітник.

Відповідно до вимог GMP рекомендується мінімізувати кількість робітників на зміні через те, що персонал може слугувати головним потенційним джерелом контамінації. Також, при правильному проведенні процесу оптимізації виробництва, можна забезпечити зменшення кількості робітників, що може допомогти знизити рівень помилок та підвищити рівень якості продукції.

Середні за добу витрати побутових стічних вод становлять:

$$Q_n = Q_n \times N_{зм} = 125 \times 3 = 375 \text{ л/добу},$$

де $N_{зм}$ – кількість змін на добу ($N_{зм} = 3$).

Загальна за добу витрата атмосферних стічних вод становлять:

$$Q_a = Q_n/15 = 375/15 = 25 \text{ л/добу}.$$

Загальні витрати стічних вод, що утворюються на підприємстві, становлять:

$$Q = Q_e + Q_n + Q_a = 86 + 375 + 25 = 486 \text{ л/добу}.$$

Очищення рідких відходів пропонується проводити за допомогою мембранного біореактора (МБР) технологія якого полягає в очищенні стічних вод, що поєднує біологічне очищення та мембранну фільтрацію. Такий підхід дозволяє

досягти високого рівня очищення води, зменшити розміри установок і підвищити ефективність процесу. Мембранний модуль затримує тверді частки, мікроорганізми та інші забруднювачі, пропускаючи тільки чисту воду. Біологічне очищення забезпечують мікроорганізми, що розкладають органічні речовини у стічних водах, перетворюючи їх на біомасу, вуглекислий газ та воду (рис 10.1) [96].

До переваг МБР системи відносять компактність та високу якість очищення, що дозволяє відмовитись від подальшого освітлення та дезінфекції та отримання малих концентрацій надлишкового мулу, що впливає на процес утилізації.

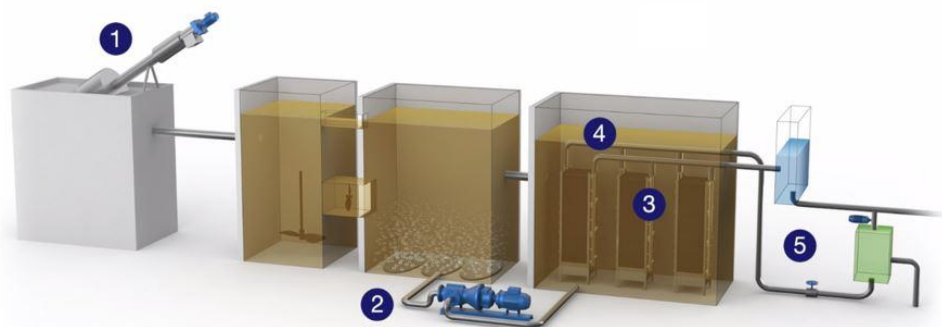


Рис. 10.1 – Схема очищення стічних вод використовуючи МБР

1 – решітка; 2 – пісколовка; 3 – мембранний біореактор; 4 – первинний відстійник [97].

10.3. Системи знешкодження газоподібних відходів

Утворення газоподібних відходів, представ аерозоль клітин у вигляді відпрацьованого повітря після аерації культуральної рідини на стадії отримання посівного матеріалу в інокуляторі 10 л та ферментері 100.

Розрахуємо об'єм відпрацьованого повітря, знаючи, що він приблизно дорівнює об'ємам аераційного повітря

1. В інокуляторі 10 л, робочий об'єм 6,6 л, отже аераційного повітря потрібно 21 л/хв, тобто 138,6 л/год. Процес отримання посівного матеріалу займає 34 год, для цього необхідно 4712,4 л аераційного повітря на виробничий цикл.

2. В ферментері 100 л, робочий об'єм 64,9 л, отже аераційного повітря потрібно 1138 л/хв, тобто 75790,8 л/год. Процес отримання посівного матеріалу займає 34 год, для цього необхідно 2576887,2 л аераційного повітря на виробничий цикл.

У сумі $2576887,2 + 4712,4 = 2581599,6$ л відпрацьованого повітря на цикл.

Абсорбційні методи очищення газів є ефективними способами видалення забруднювачів шляхом їх розчинення в рідині. Ці методи широко використовуються в промисловості для очищення викидів та забезпечення екологічної безпеки. Абсорбція базується на фізико-хімічному процесі, під час якого молекули газу поглинаються рідиною (абсорбентом). Цей процес може бути фізичним (залежить від розчинності газу в рідині) або хімічним (залежить від реакцій газу з рідиною) [98]. Безвідходна абсорбційно-десорбційна циклічна схема – це ефективний підхід до очищення газів, який дозволяє мінімізувати або повністю уникнути утворення відходів за рахунок повторного використання абсорбентів. У такій схемі абсорбент не втрачається після насичення, а піддається регенерації і знову використовується в процесі очищення газів. Для процесу знешкодження газоподібних відходів запропоновано використовувати дану систему (рис. 10.2). Як промислові адсорбенти, можна застосовувати активоване вугілля, силікагель, алюмогель, природні та синтетичні цеоліти (молекулярні сита). Основними вимогами, що висуваються до промислових сорбентів – це висока здатність до поглинання, вибірковість дії (селективність), термічна стійкість, тривала служба без зміни структури і властивостей поверхні, можливість легкої регенерації. Найчастіше обирається активне вугілля, що застосовують для санітарної очистки газів через його високі поглинаючі властивості і легкість відновлення.

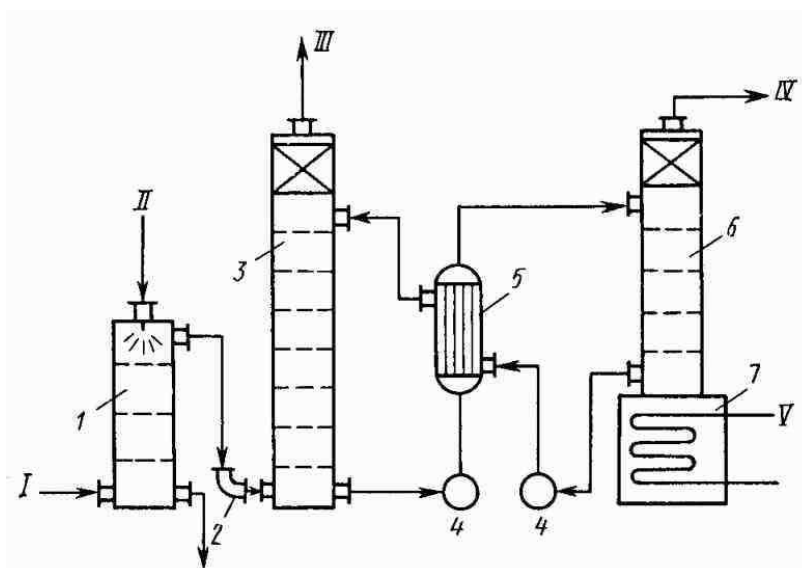


Рис. 10.2 - Схема абсорбції в пінних абсорберах

1 - холодильник, 2 - повітродувка; 3 - пінний абсорбер; 4 - насос; 5 - теплообмінник; 6 - пінний десорбер; 7 - кип'ятильник десорбера; I - газ на очищення; II - вода; III - очищений газ; IV - діоксид вуглецю споживачеві; V – пар [99].

10.4. Системи знешкодження твердих відходів

На виробництві накопичується невелика кількість твердих відходів. Пакувальні матеріали, тара з миючих засобів та скло рекомендується збирати в окремі контейнери з кришками, сортувати і передавати на переробку до пунктів вторсировини. Цей процес забезпечує ефективне використання ресурсів та допомагає знизити негативний вплив на довкілля. Клітини продуценту, що залишаються після центрифугування, використані фільтри піддаються спеціальній обробці в автоклаві. Також бактерії роду *Bacillus* доцільно використовувати у якості компосту у сільськогосподарській галузі.

Непридатні хімічні реактиви вимагають особливих заходів зберігання та утилізації. Рекомендується зберігання в окремо виділеній шафі і подальша передача для утилізації спеціалізованим організаціям, що відповідають за відновлення та поводження з небезпечними хімічними речовинами згідно з вимогами технологічних стандартів [100].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Levy M., Kolodziejczyk A.A., Thaïss C.A., Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2017, 17(4): 219–232. doi: 10.1038/nri.2017.7.
2. Gagliardi A., Totino V., Cacciotti F., Iebba V., Neroni B., Bonfiglio G., Trancassini M., Passariello C., Pantanella F., Schippa S. Rebuilding the Gut Microbiota Ecosystem. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2018, 15(8) 1679. doi: 10.3390/ijerph15081679.
3. Elshaghabee F.M.F., Rokana N., Gulhane R.D., Sharma C., Panwar H. *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Front. Microbiol.* 2017, 8: 1490. doi:10.3389/fmicb.2017.01490.
4. Jayanthi N., Ratna Sudha M. *Bacillus clausii* - The Probiotic of Choice in the Treatment of Diarrhoea. *J Yoga Phys Ther.* 2015, 5(4): 211. doi:10.4172/2157-7595.1000211
5. Acosta-Rodríguez-Bueno C.P., Abreu Y., Abreu A.T., Guarner F., Guno M.J.V., Pehlivanoglu E., Perez M. 3rd. *Bacillus clausii* for Gastrointestinal Disorders: A Narrative Literature Review. *Adv Ther.* 2022, 39(11): 4854-4874. doi: 10.1007/s12325-022-02285-0.
6. Lopetuso L.R., Scaldaferri F., Franceschi F., Gasbarrini A. *Bacillus clausii* and gut homeostasis: State of the art and future perspectives. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2016, 10(8): 943–948. doi: 10.1080/17474124.2016.1200465
7. dos Santos D.F.A., dos Santos S.S.F. *Bacillus clausii*: Review of characteristics and applications in medicine, biotechnology and the food industry. *Rev. Biocienc.* 2019, 25: 29–38.
8. Спеціалізоване медичне інтернет-видання Компендіум [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/>
9. Cenci G, Trotta F, Caldini G. Tolerance to challenges miming gastrointestinal transit by spores and vegetative cells of *Bacillus clausii*. *J Appl Microbiol.* 2006, 101(6): 1208-15. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03042.x.
10. Urdaci M. C., Bressollier P., Pinchuk I. *Bacillus clausii* Probiotic Strains. *J. of Clinical Gastroenterology.* 2004, 38(2). doi: 10.1097/01.mcg.0000128925.06662.69

11. Ripert G., Racedo S.M., Elie A.M., Jacquot C., Bressollier P., Urdaci M.C. Secreted Compounds of the Probiotic *Bacillus clausii* Strain O/C Inhibit the Cytotoxic Effects Induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* Toxins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016, 60: 3445–3454. doi: 10.1128/AAC.02815-15.
12. Ghelardi E., Abreu y Abreu A.T., Marzet C.B., Álvarez Calatayud G., Perez M. III, Moschione Castro A.P. Current Progress and Future Perspectives on the Use of *Bacillus clausii*. *Microorganisms.* 2022, 10(6): 1246. doi:10.3390/microorganisms10061246.
13. Tabandeh F., Hosseini Moghaddam H. R., Yakhchali B., Shariati P., Hamed Mousavian M. T., Ghasemi F. Fed-batch fermentation of *Bacillus clausii* for efficient production of alkaline protease using different feeding strategies. *Chemical Engineering Communications.* 2011, 198(9): 1063–1074. doi:10.1080/00986445.2011.552024
14. Paparo L., Tripodi L., Bruno C., Pisapia L., Damiano C., Pastore L., Berni Canani, R. Protective action of *Bacillus clausii* probiotic strains in an in vitro model of Rotavirus infection. *Scientific Reports.* 2020, 10(1). doi:10.1038/s41598-020-69533-7
15. Christiansen T., Michaelsen S., Wümpelmann M., Nielsen J. Production of savinase and population viability of *Bacillus clausii* during high-cell-density fed-batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering.* 2003, 83(3): 344–352. doi:10.1002/bit.10675
16. Neves C.R.S.S, Penna T.C.V. Benzene Biodegradation by *Bacillus Subtilis* in Water and Validation System with Kefir Grains as Biological Indicator. *J. Biology, Agriculture and Health science.* 2015, 4(3): 96-101.
17. Barrett AJ. Proteases. *Curr Protoc Protein Sci.* 2001, 21(1). doi: 10.1002/0471140864.ps2101s21.
18. Princess I., Natarajan T., Ghosh S. When good bacteria behave badly: a case report of *Bacillus clausii* sepsis in an immunocompetent adult. *Access Microbiology.* 2020. doi: 10.1099/acmi.0.000097
19. Juan P.G., Alzate J.A., Hoyos J.A., Cristancho E. Bacteremia after *Bacillus clausii* administration for the treatment of acute diarrhea: A case report. *Revista Biomédica.* 2021, 41 (2): 13-20. doi: 10.7705/biomedica.5662

20. Bozdogan B., Galopin S., Leclercq R. Characterization of a new erm-related macrolide resistance gene present in probiotic strains of *Bacillus clausii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70: 280–284.
21. Ahire J.J., Kashikar M.S., Madempudi R.S. Survival and Germination of *Bacillus clausii* UBBC07 Spores in in vitro Human Gastrointestinal Tract Simulation Model and Evaluation of Clausin Production. *Front. Microbiol.* 2020, 11: 1010
22. Kong X.X., Jiang J.L., Qiao B., Liu H., Cheng J.S., Yuan Y.J. The biodegradation of cefuroxime, cefotaxime and cefpirome by the synthetic consortium with probiotic *Bacillus clausii* and investigation of their potential biodegradation pathways. *Sci. Total Environ.* 2019, 651: 271–280.
23. Abbrescia A.P., Palese L.L., Papa S., Gaballo A., Alifano P., Sardanelli A.M. Antibiotic Sensitivity of *Bacillus clausii* Strains in Commercial Preparation. *Clin. Immunol. Endocr. Metab. Drugs.* 2014, 1: 102–110.
24. Girlich D., Leclercq R., Naas T., Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of the chromosome-encoded class A β -lactamase BCL-1 from *Bacillus clausii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, 51: 4009–4014
25. Galopin S., Cattoir V., Leclercq R.A. Chromosomal chloramphenicol acetyltransferase determinant from a probiotic strain of *Bacillus clausii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2009, 296: 185–189.
26. U.S. Patent № 8,691,773 Peptide Compound with Biological Activity, Its Preparation and Its Application / Bressollier P., Brugo M.A., Robineau P., Schmitter J.M., Sofeir M., Urdaci M.C. Verneuil B. 6. 04. 2007.
27. Rochin-Medina J.J., Ramirez K., Rangel-Peraza J.G., Bustos-Terrones, Y.A. Increase of content and bioactivity of total phenolic compounds from spent coffee grounds through solid state fermentation by *Bacillus clausii*. *J. Food Sci. Technol.* 2018, 55: 915–923
28. Patel C., Patel P., Acharya, S. Therapeutic Prospective of a Spore-Forming Probiotic-*Bacillus clausii* UBBC07 Against Acetaminophen-Induced Uremia in Rats. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 2020, 12: 253–258

29. Yu M.G.T.R., Tuano D.F., Tud R.M., Umali A., Umandap C.H., Ver M.L., Villalobos R.E., Villanueva A.P., Villarante K.L., Villasenor L. Histomorphologic Effects of *Bacillus clausii* spores in Enteropathogenic E. coli O127:H21-infected Mice: A Pilot Study. Philipp. J. Intern. Med. 2016, 54.
30. Определитель бактерий Берги - 9-е изд. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др.; Пер. с англ. под ред. Г.А. Заварзина. - М.: Мир. - ISBN 5-03-003110-3 – 800 с.
31. Макаренко О.М., Петров П.І., Лугіна С.В. Сучасний погляд на проблему профілактики та лікування дисбактеріозу. Актуальні проблеми сучасної медицини. 2016, 16 (2): 294-300.
32. Ткаченко Н.В. Ентерожерміна - ефективний пробіотик-біоентеросептик для лікування гострих та хронічних захворювань кишечника. Дитячий лікар. 2014, 5(34):47-9.
33. Чисельність дітей та молоді в Україні [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://inmol.org/chyselnist-ditej-ta-molodi-v-ukraini/>
34. ТОВ «АПТЕКА 911.ЮА» Ентерожерміна капсули блістер 12 шт. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://apteka911.ua/ua/shop/enterozhermina-kaps-12-p8923>
35. ТОВ «АПТЕКА 911.ЮА» Ентерожерміна суспензія оральна у флаконах по 5 мл 10 шт. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://apteka911.ua/ua/shop/enterozhermina-susp-oraln-fl-5ml-10-p5336>
36. ТОВ «АПТЕКА 911.ЮА» Ентерожерміна форте суспензія оральна в флаконах по 5 мл 10 шт. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://apteka911.ua/ua/shop/enterozhermina-forte-susp-oral-fl-5ml-10-p49494>
37. ТОВ «АПТЕКА 911.ЮА» Євро-Біотик Суспензія оральная в флаконах по 5 мл 10 шт. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://apteka911.ua/ua/shop/evro-biotik-suspenziya-oralnaya-v-flakonah-po-5-ml-10-sht-p241858>
38. ТОВ «АПТЕКА 911.ЮА» Ентерожерміна форте суспензія оральна в флаконах по 5 мл 10 шт [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://apteka911.ua/ua/shop/enterozhermina-forte-susp-oral-fl-5ml-10-p49494>

39. ТОВ «АПТЕКА 911.ЮА» Ентерожерміна форте суспензія оральна в флаконах по 5 мл 5 шт [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://apteka911.ua/ua/shop/enterozhermina-forte-susp-oral-fl-5ml-5-p265102>
40. Probiotics Fact Sheet for Health Professionals [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Probiotics-HealthProfessional/>
41. ТОВ Грін-віза Пробіотик 7 серія Фітофорте 30 капсул [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://greenvisa.com.ua/product/probiotik-7-seriya-fitoforte-30-kapsul/>
42. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/bcl01100>
43. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/map00290+C00183>
44. Пирог Т.П. Біохімічні основи мікробного синтезу [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»/ Т.П. Пирог, Л.В.Ключка. – К.: НУХТ, 2019. – 81 с.
45. Машинобудівний завод ТМ ПРОМВІТ (ООО НПК Промфарм) [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rabochim-obemom-100-l/>
46. GrowPro Фільтр грубої очистки повітря DustFilter E100 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://growpro.ua/ua/catalog/detail/filtr-gruboy-ochistki-vozdukha-dustfilter-e100/>
47. ВЕНТ-ФІЛЬТР, виробник промислових повітряних фільтрів: кишенькові, рукавні, панельні, стельові, підлогові, фільтри НЕРА. Фільтри повітряні касетні, клас фільтрації F6 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtry-vozdushnye-kassetnye-klass-filtratsii-f7/>
48. Промислове обладнання від ТОВ "ТБК "ІНТЕРХОЛОД" Фільтри тонкого очищення ДК-350/Д-23 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://interholod.com.ua/ua/p716654683-filtry-tonkoj-ochistki.html>

49. Пенчук Ю.М. Загальна біотехнологія [Електронний ресурс]: Конспект лекцій для здобув. освітнього рівня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-проф. прог. «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / Ю.М. Пенчук. – К.: НУХТ, 2019. – 80 с.

50. Державний реєстр дезінфекційних засобів 2020 рік. [Електронний ресурс] – Режим доступа: <https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%94%D0%B5%D1%80%D0%B6%D1%80%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B2/10-11-2023/%D0%A0%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B2%20908.xlsx>

51. КлінДез 401 – дезінфекція ПСО [Електронний ресурс] – Режим доступа: <https://www.mpi-dpr.com.ua/uk/na-golovnu/klindez-401-dezinfekciya-pso>

52. Дезосепт форте [Електронний ресурс] – Режим доступа: <https://www.datonal.org/?m0prm=3&m1prm=4&showItem=27>

53. Біомой <https://farmakos.ua/ua/bimoj.html>

54. Хлорнтоін НВ ТОВ "Фармакос" [Електронний ресурс] – Режим доступа: <https://farmakos.ua/ua/hlor.html>

55. ТОВ «ДАНА МЕДИКАЛ» дезінфікувальний засіб «Ладоксин» Державна реєстрація №973 - 19.08.2020 р. [Електронний ресурс] – Режим доступа: <https://med.viola.net.ua/dezinfektsiya-ta-myyuchi-zasoby/dezinfektsiya-ta-antyseptyky/ladoksyn-tov-dana-medikal-ukrayina>

56. Квікцид №05.03.02-04/21440 [Електронний ресурс] – Режим доступа: http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/upl/admin_upload/dana/kvikcid.pdf

57. ТОВ “Сартокарат” Biostat® Cplus [Електронний ресурс]. – Режим доступа: <https://sartorius.com.ua/ru/fermentyory-i-bioreaktory/sterilizuemye-na-meste-fermentery-bioreaktory-cip/biostat-cplus/>

58. Машинобудівний завод ТМ ПРОМВІТ Лабораторний реактор РП-5 для МЛФ (креми, мазі, гелі) 5 л [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://promvit.com.ua/laboratornyj-reaktor-rp-5-dlya-mlf-kremy-mazi-geli-5-l/>
59. Машинобудівний завод ТМ ПРОМВІТ Реактор РГС 50 л GMP [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-rgs-50-l-gmp/#>
60. СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020. Лікарські засоби. Належна виробнича практика. – К. Міністерство охорони здоров'я України, 2009
61. Смирнов В.О., Білецький В.С. Флотаційні методи збагачення корисних копалин. – Донецьк: Східний видавничий дім. 2010. – 492 с.
62. Торгова компанія ООО "Силоксан" [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://siloxane.com.ua/ua/p40719626-silfoam.html>
63. ОФІЦІЙНИЙ ПРЕДСТАВНИК КОМПАНІЇ DELTAFAN ВОДЯНЕ ОПАЛЕННЯ І ОСЬОВІ ВЕНТИЛЯТОРИ Повітрозабірник airer deltafan maxi [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://deltafan.com.ua/product/povitrozabirnyk-airer-deltafan-maxi/>
64. Інтернет-гіпермаркет «STORGOM» Компресор двоступінчатий з ремінною передачею Fini BK119-500F-7.5 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://storgom.ua/ua/product/kompressor-dvuhstupenchatyi-s-remennoi-peredachei-fini-bk119-500f-75.html#properties-tab>
65. ТОВ «Торговий дім ОЛЛТАН» Теплообмінник дворядний 90-50 \ 2R Roen Est [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://vts-clima.com.ua/uk/p/569598118-teploobmennik-dvuhryadnyy-90-50-2r-roen-est/>
66. ТОВ "Сервісна компанія "Конгур" РЕСИВЕР ПОВІТРЯНИЙ ВЕРТИКАЛЬНИЙ РВ 100.370 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://kongyr.com.ua/ua/resiver-vozdushniy-vertikalniy-rv-100-370/>
67. ВЕНТ-ФІЛЬТР, виробник промислових повітряних фільтрів: кишенькові, рукавні, панельні, стельові, підлогові, фільтри НЕРА. Фільтри повітряні касетні, клас фільтрації F6 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtry-vozdushnye-kassetnye-klass-filtratsii-f7/>

68. Indiamart. IMport Digital Semi-Automatic Weighing Machine 0.1-100 Gm, For Business [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.indiamart.com/proddetail/semi-automatic-weighing-machine-0-1-100-gm-23553181488.html>

69. ТОВ "ЕТАТРОН-УКРАЇНА" Перистальтичний насос ВНЗ-V [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.etatron.com.ua/pumps/peristaltic_pumps/bh3-v/

70. Промислове обладнання від ТОВ "ТБК "ІНТЕРХОЛОД" Фільтри тонкого очищення ДК-350/Д-23 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://interholod.com.ua/ua/p716654683-filtry-tonkoj-ochistki.html>

71. Міністерство охорони здоров'я України Наказ 14.01.2004 №5 Про затвердження Порядку одержання, обліку, зберігання та утримання тест-штамів мікроорганізмів для проведення контролю якості лікарських засобів за мікробіологічними показниками.

72. American Type Culture Collection [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.atcc.org/products/700160#product-references>

73. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: лаб. практикум для здобув. осв. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» ОПП «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. та заоч. форм навч. / уклад.: В.О. Красінько, Т.Л. Сулейко, В.В. Потапенко – К.: НУХТ, 2023. – 61 с.

74. García J.P., Alzate J.A., Hoyos J.A., Cristancho E. Bacteremia after *Bacillus clausii* administration for the treatment of acute diarrhea: A case report. Biomedica. 2021, 41(2): 13-20. doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.5662>

75. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни "Промислова та екологічна біотехнологія" для студентів очної форми навчання та після дипломної освіти зі спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія першого (бакалаврського) рівня /Укладач: Корнієнко І. М. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 51 с.

76. Patrone V., Molinari P., Morelli L. Microbiological and molecular characterization of commercially available probiotics containing *Bacillus clausii* from India

and Pakistan. International Journal of Food Microbiology. 2016, 237: 92–97. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.012

77. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія : підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад / За редакцією В.П.Широбокова / Видання 2-е. – Вінниця : Нова Книга, 2011. – 952 с.: іл.

78. Caudy A. A. Spectrophotometric Analysis of Ethanol and Glucose Concentrations in Yeast Culture Media. Cold Spring Harbor Protocols. 2017, (9). doi: 10.1101/pdb.prot089102

79. Ridnour, L. A., Sim, J. E., Hayward, M. A., Wink, D. A., Martin, S. M., Buettner, G. R., & Spitz, D. R. A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate in cell culture media. Analytical biochemistry, 2000, 281(2), 223–229. doi: 10.1006/abio.2000.4583.

80. Solid composition containing bacillus-type non-pathogenic bacterial spores : пат.US8039006B2 United States : 10/484.937 18.10.2021. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://patents.google.com/patent/US8039006B2/en>

81. VertMarkets, Inc. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.cellandgene.com/doc/stainless-steel-centrifuges-for-regenerative-medicines-powerfuge-p-0001>

82. Krishna, V., Zhao, J., Koopman, B., Moudgil, B. Purification procedure sensitizes *Bacillus* endospores to free radicals from UVA radiation and photocatalysis. International Journal of Astrobiology, 1–7, 2017. doi:10.1017/s1473550417000258

83. Zhao, J., Krishna, V., Moudgil, B., & Koopman, B. Evaluation of endospore purification methods applied to *Bacillus cereus*. Separation and Purification Technology, 2008, 61(3), 341–347. doi:10.1016/j.seppur.2007.11.002

84. Сидоров Ю.І. Лабораторні та пілотні ліофільні сушарки періодичної дії в біотехнології / Ю.І. Сидоров // Біотехнологія. – 2012. – №5 (5). – С. 9–15.

85. «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XI Всеукраїнської науковопрактичної конференції / Міністерство освіти і науки України, КПІ ім. Ігоря Сікорського, Національна академія наук України, Інститут клітинної біології та

генетичної інженерії. – Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, Вид-во «Політехніка», 2017. – 188 с.

86. Шугай М., Чорна Н. Сублімаційне сушіння бактеріальних препаратів на основі *Lactobacillus casei*. Продовольчі ресурси, 2021, 9(17), 174–181. doi: 10.31073/foodresources2021-17-18

87. Ільчук, М. П., Доломакін, Ю. Ю. Сушіння грануляту в порційній сушарці псевдозрідженням шаром. 2014.

88. Орішкевич С.О., Собченко Г.О. Моделювання процесу термообробки дрібнодисперсних матеріалів в інертному псевдозрідженному шарі. *Ceramics: Science and Life*, 2015, 2 (27), 4-9.

89. *Curr Med Chem*. Antibiotic Sensitivity of *Bacillus clausii* Strains in Commercial Preparation. 2014, 1(2), 102–110. doi: 10.2174/2212707002666150128195631

90. ТОВ Чанчжоу Xinggan Сушка Обладнання Со. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://ua.star-drying.com/dryer/fluidized-bed-dryer/vertical-fluid-bed-dryer.html>

91. Senieer Pharmaceutical Bin [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.senieer.com/bin-and-drum/>

92. Himiks [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://khimmix.ua/ua/smesiteli-dlya-sypuchih/smesitel-v-obraznyj-100l>

93. Ruian Antai Pharmaceutical Machinery Co., Ltd. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://ua.antaipacking.com/capsule-filling-machine/fully-automatic-capsule-filling-machine/pharmaceutical-capsule-filling-machine.html>

94. ТОВ "Чумаки в Китаї" Постачальник обладнання [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://chumaki.in.ua/ua/p1076415253-avtomatichnij-blister-dlya.html>

95. Чуєшов В. І., Гладух Є.В. Технологія ліків промислового виробництва. Том 2: підручник для фарм. ф-тів ВМНЗ IV р.а. – Вінниця: Нова Книга, 2014 – 664 с.

96. Петрук В.Г., Северин Л. І., Васильківський І. В., Безвозюк І. І. Природоохоронні технології: навч. посіб. Ч.2 : Методи очищення стічних вод / В.Г.Петрук, Л.І.Северин, І.В. Васильківський, І.І.Безвознюк. Вінниця : ВНТУ, 2014. – 258 с.

97. ТОВ "Аквантіс". Інженерія води.

https://aquantis.com.ua/uk/technology/3?slug=tehnologija_ochyschennja_stichnyh_vod_biobox_mbr

98. Чернякова О.І. Методи захисту атмосфери : конспект лекцій. Одеса: ОДЕКУ, 2019. 89 с.

99. Гигина О.С. Методи і технічні засоби захисту атмосферного повітря від забруднення та очищення газів, що відходять, 2010.

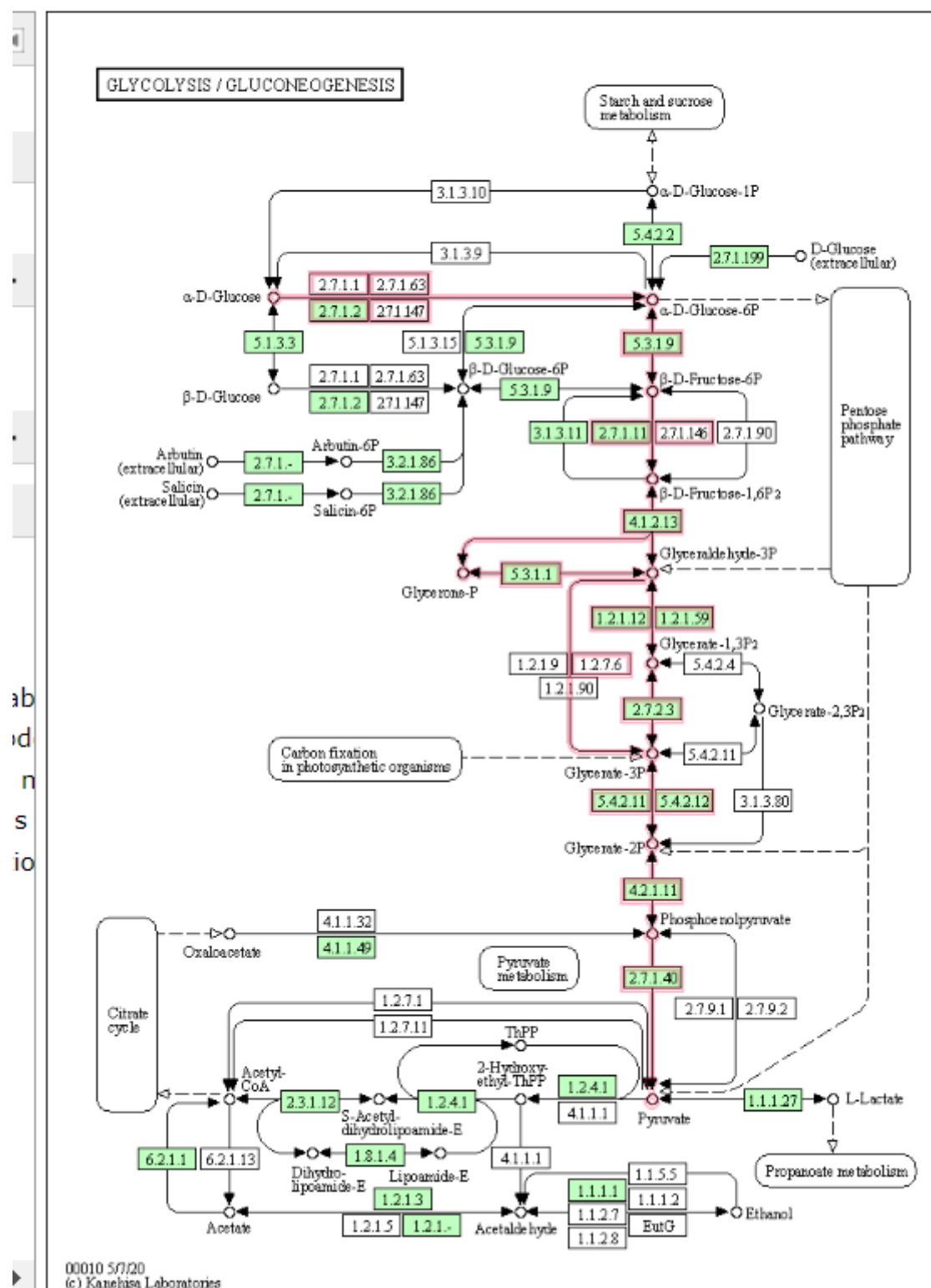
100. Зацеркляний, М. М. Процеси захисту навколишнього середовища : підручник / М. М. Зацеркляний, О. М. Зацеркляний, Т. Б. Столевич ; Одес. нац. акад. харч. технологій. Одеса : Фенікс, 2017. – 454 с.

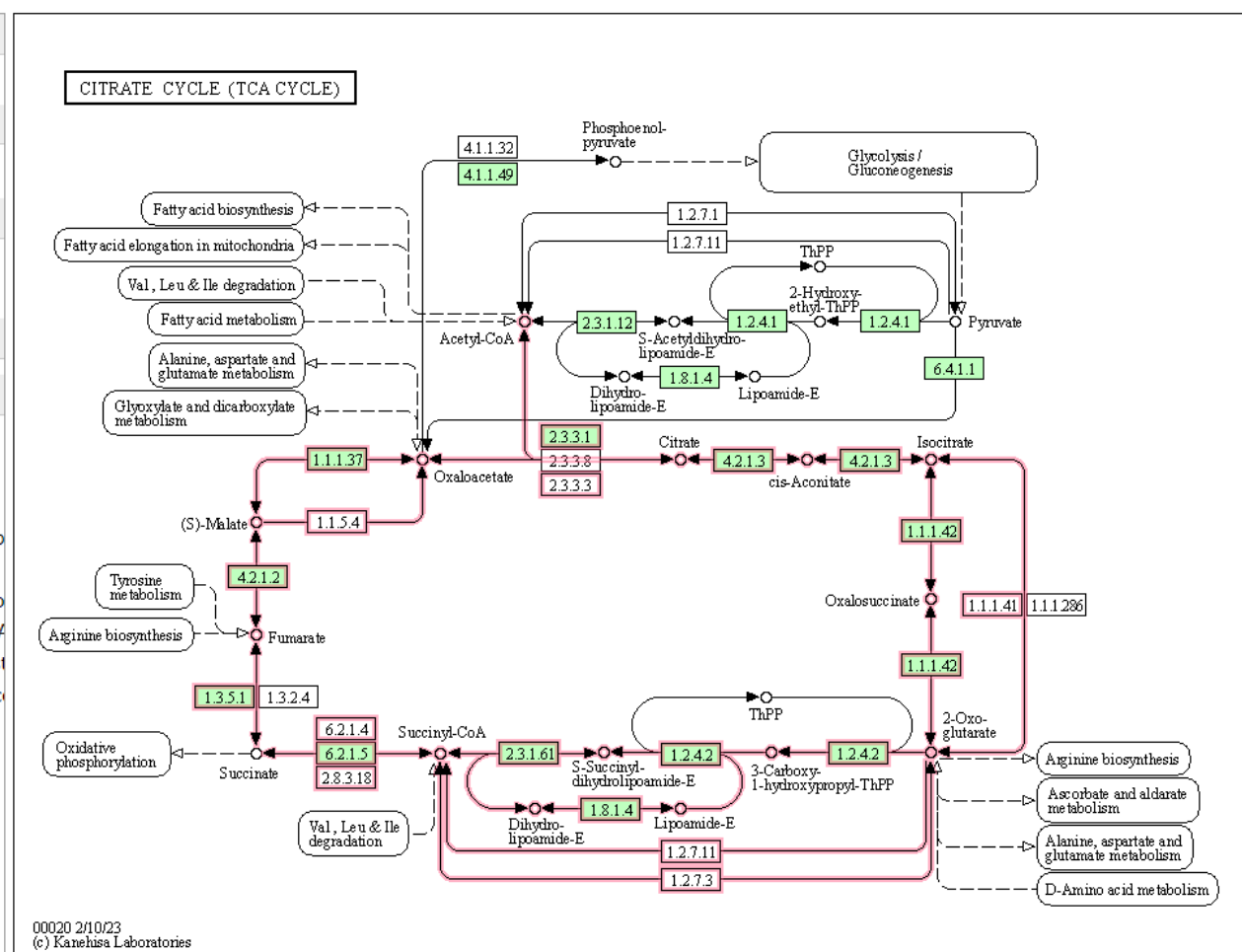
Batch Fermentation

A modified inoculum medium was used for protease production during batch and fed-batch fermentations. It consisted of (g/L): glucose, 10; KNO₃, 4; yeast extract, 10; K₂HPO₄, 4; Na₃C₆H₅O₇, 4; MgSO₄ · 7H₂O, 0.5; Na₂CO₃, 10; and trace elements solution with the aforementioned composition (1% (v/v)). Protease production was investigated in a 3 L Bioflo 3000 fermenter (New Brunswick Scientific Co., USA) with a 2 L working volume. A two-stage inoculum was applied for inoculation of the fermenter. Fermentation was carried out at 35°C with an agitation rate of 400–900 rpm and an aeration rate of 0.6 vvm, but without pH control during the batch and fed-batch stages. In order to avoid oxygen limitation, the dissolved oxygen was not allowed to fall below the critical point of 40%. Foam was controlled by addition of a sterilized silicon antifoaming reagent.

oneogenesis - *Alkalihalobacillus clausii*

[[Pathway entry](#) | [Show description](#) | [Download](#) | [Help](#)]



cycle) - *Alkalihalobacillus clausii*
[Pathway entry](#) | [Show description](#) | [Download](#) | [Help](#)


2.3.2. *Ethanol*

Culture was harvested and the pellet was washed once with sterile deionized water as before. The pellet was resuspended in 20 mL of 1:1 sterile deionized water and ethanol (200 proof; 99.5%). The centrifuge tube was capped and incubated at 22 °C for 12 h on an orbital shaker (Lab Line) at 100 rev/min (3-day culture) or for 2 h at 200 rev/min (10-day culture). The suspension was then washed twice with sterile deionized water.