

**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)

«\_\_» лютого 2025 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_ *Віктор СТАБНИКОВ*

(підпис) (ім'я та прізвище)

«\_\_» лютого 2025 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА  
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності \_\_\_\_\_ 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми \_\_\_\_\_ «Біотехнології: фармацевтична,  
промислова, харчова, природоохоронна»

на тему: Одержання біомаси *Bifidobacterium bifidum* для виробництва  
Біфідумбактерину

Виконав: здобувач 5 курсу, групи 1

\_\_\_\_\_ *ЮЩЕНКО Надія Олександрівна*

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СТАРОВОЙТОВА Світлана Олександрівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти \_\_\_\_\_

(прізвище та ініціали)

(підпис)

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали)

(підпис)

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент \_\_\_\_\_

Наталія ТИМОШОК

(прізвище та ініціали)

(підпис)

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

Здобувач \_\_\_\_\_

(підпис)

Київ - 2025р.

# 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\_” листопада 2024 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ЮЩЕНКО Надії Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи: Одержання біомаси *Bifidobacterium bifidum* для виробництва Біфідумбактерину

керівник роботи СТАРОВОЙТОВА Світлана Олександрівна, к.б.н., доц.,

( прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 05 листопада 2024 року № 932-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 07.02.2025.

3. Вихідні дані до роботи Геометричний об'єм ферментера 0,3м<sup>3</sup>, коефіцієнт заповнення становить 0,8

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)  
Характеристика цільового продукту, характеристика біологічного агента, техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору технологічної схеми, специфікація обладнання, опис технологічної схеми, контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема 1 аркуш формату А2 та апаратурна схема 1 аркуш формату А2

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання \_\_\_\_\_ 01 листопада 2024 року \_\_\_\_\_

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика пробіотика Біфідумбактерина	01.11.2024-12.01.2024	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	01.11.2024-12.01.2024	
3	Техніко-економічне обґрунтування	13.11.2024.-29.11.2024.	
4	Обґрунтування вибору допоміжний стадій виробництва	30.11.2024.-16.12.2024.	
5	Специфікація обладнання	16.12.2024-30.12.2024.	
6	Опис технологічної схеми	09.01.2025.-20.01.2025.	
7	Контроль виробництва	21.01.2025.-31.01.2025.	
8	Охорона довкілля	01.02.2025.-04.02.2025.	

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Керівник роботи \_\_\_\_\_  
(підпис)

Надія ЮЩЕНКО \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

Світлана СТАРОВОЙТОВА \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Представлено проект, у якому ми розробили виробництво біомаси *Bifidobacterium bifidum* для створення Біфідумбактерину. Нами розрахована потужність виробництва, що становить 5,5 м<sup>3</sup>/рік культуральної рідини.

У нашій роботі ми представили технологію виробництва біомаси, здійснили техніко-економічний розрахунок та визначили необхідну її кількість для забезпечення потреб виробництва. За нашими параметрами тривалість культивування біологічного агента становить 24 год., температура 37°C.

На основі аналізу та порівняння потенційних штамів біфідобактерій для виробництва Біфідумбактерину було обрано штам *Bifidobacterium bifidum* 1, що проявляє найвищу антагоністичну активність по відношенню до всіх патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, а також накопичує 4,14 г/л біомаси та має  $2,5 \times 10^9$  КУО/мл.

Технологічний процес охоплює як допоміжні операції (підготовка персоналу, дезінфікуючих та миючих засобів; підготовка приміщень та обладнання; підготовка азоту для культивування, приготування та стерилізація титрувальних агентів, запасних розчинів мікроелементів та поживних середовищ), так і основний процес, що включає три етапи вирощування посівного матеріалу і подальший біосинтез у ферментері об'ємом 0,3 м<sup>3</sup>, з коефіцієнтом заповнення 0,8. Технологія виробництва Біфідумбактерину базується на одностадійному глибинному періодичному способі культивування.

Обсяг кваліфікаційної роботи – 81 сторінок. Містить 7 рисунки, 19 таблиць. Робота виконана на основі 31 літературних джерел та технологічної схеми формату А2 та апаратурної схеми формату А2.

**Ключові слова:** біомаса, біосинтез, Біфідумбактерин, пробіотик, *Bifidobacterium bifidum*.

## ABSTRACT

We present a project in which we have developed the production of *Bifidobacterium bifidum* biomass for the creation of Bifidumbacterin. We have calculated the production capacity, which amounts to 5.5 m<sup>3</sup>/year of culture fluid.

In our work, we have presented the biomass production technology, performed technical and economic calculations, and determined the required quantity to meet production needs. According to our parameters, the cultivation duration of the biological agent is 24 hours at a temperature of 37°C.

Based on the analysis and comparison of potential strains of bifidobacteria for the production of Bifidumbacterin, the strain *Bifidobacterium bifidum* 1 was selected, which exhibits the highest antagonistic activity against all pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms, and also accumulates 4.14 g/l of biomass and has  $2,5 \times 10^9$  CFU/ml.

The technological process includes both auxiliary operations (training of personnel, disinfectants and detergents; preparation of premises and equipment; preparation of nitrogen for cultivation, preparation and sterilization of titrating agents, stock solutions of trace elements and nutrient media), and the main process, which includes three stages of growing seed material and subsequent biosynthesis in a fermenter with a volume of 0.3 m<sup>3</sup>, with a filling factor of 0.8. The technology for producing Bifidumbacterin is based on a single-stage deep periodic cultivation method.

The volume of the qualification work is 81 pages. Contains 7 figures, 19 tables. The work was carried out on the basis of 31 literary sources and a technological scheme of format A2 and an apparatus scheme of format A2.

**Keywords:** biomass, biosynthesis, Bifidumbacterin, probiotic, *Bifidobacterium bifidum*.

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	7
<b>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБІОТИКА БІФІДУМБАКТЕРИНА</b> ...	9
<b>РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</b> .....	10
2.1. <i>Обґрунтування вибору <i>Bifidobacterium bifidum</i></i> .....	10
2.2. <i>Таксономічний статус</i> .....	14
2.3. <i>Морфолого-культуральні ознаки</i> .....	15
2.4. <i>Фізіолого-біохімічні ознаки</i> .....	16
<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ</b> .....	18
3.1 <i>Потреба населення України в Біфідумбактерині</i> .....	18
3.2. <i>Розрахунок потужності виробництва Біфідумбактерина</i> .....	20
3.3 <i>Розрахунок геометричного об'єму ферментера</i> .....	21
3.4. <i>Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу</i> .....	24
3.5. <i>Схема біотрансформації ростового субстрату</i> .....	24
<b>РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА</b> .....	26
4.1. <i>Обґрунтування необхідності забезпечення анаеробного культивування</i> ..	26
4.2. <i>Обґрунтування способу приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу</i> .....	27
4.2.1. <i>Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту у флаконі</i> .....	29
4.2.2. <i>Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах</i> .....	29
4.2.3. <i>Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 300 л</i> .....	30
4.3. <i>Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН</i> .....	31
<b>РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b> .....	36
<b>РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b> .....	36
<b>РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</b> .....	50
7.1. <i>Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища, чистоти посівного матеріалу та чистоти культуральної рідини</i> .....	50
7.2. <i>Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю</i> .....	53

<i>7.3. Визначення концентрації біомаси.....</i>	55
<i>7.4. Визначення кількості життєздатних клітин .....</i>	55
<i>7.5. Карта поетадійного контролю .....</i>	56
<b>РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ .....</b>	<b>62</b>
<b>ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА.....</b>	<b>74</b>
<b>ДОДАТКИ</b>	

## ВСТУП

Пробіотики відіграють значну роль у сучасній науці та медицині, оскільки сприяють збереженню здоров'я людини шляхом нормалізації мікрофлори організму. Під цим терміном розуміють живі мікроорганізми, які при достатньому надходженні до організму забезпечують позитивний вплив на стан здоров'я. Серед найбільш вивчених і поширених пробіотичних культур виділяють *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та окремі штами дріжджових грибків. Їх використання охоплює профілактику та лікування таких захворювань, як дисбактеріоз, кишкові інфекції, алергічні реакції, а також сприяє зміцненню імунітету.

Впровадження пробіотичних препаратів у медичну практику сприяє розв'язанню важливих соціально-медичних питань, зокрема зниженню рівня захворюваності, поліпшенню якості життя та загальному зміцненню здоров'я населення. Крім того, пробіотики допомагають боротися з наслідками стресу, незбалансованого раціону та негативних впливів навколишнього середовища. Завдяки своїм унікальним властивостям вони стали невід'ємною частиною концепції здорового харчування та профілактичної медицини.

**Актуальність** цієї теми обумовлена необхідністю вдосконалення методів отримання біомаси пробіотичних мікроорганізмів. Раціональне культивування *Bifidobacterium bifidum* дає змогу отримати високий рівень біомаси з оптимальними характеристиками для подальшого використання у виробництві Біфідумбактерину. Зважаючи на зростаючу конкуренцію та високі стандарти якості, важливо розробляти ефективні, економічно вигідні та екологічно безпечні технології виробництва пробіотичних препаратів.

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ</b>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Ющенко Н.О.				Літ.	Арк.
Перевір.		Старовойтова С.О.					Акрушів
Реценз.						7	81
Н. Контр.					ВСТУП	Кафедра БТМ	
Затверд.		Стабніков В.П.					7

**Новизна** роботи полягає у вдосконаленні умов культивування *Bifidobacterium bifidum*, що забезпечують підвищення виходу біомаси та покращення її функціональних властивостей. Це включає оптимізацію середовища для вирощування, параметрів культивування та методів збору й обробки біомаси. Дослідження сприятимуть створенню технології, яка забезпечить стабільну якість та ефективність пробіотичного препарату.

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБІОТИКА БІФІДУМБАКТЕРИНА

Біфідобактерії виду *Bifidobacterium bifidum* є основою дієтичної добавки Біфідумбактерин, яка містить  $1 \cdot 10^7$  КУО живих мікроорганізмів в одній дозі та допомагає відновити й підтримати здорову мікрофлору кишечника [1].

На фармацевтичному ринку України цей препарат являє собою лікарський засіб «Біфідумбактерин» у вигляді капсул або порошку, який на сьогодні, виробляють ДП «Ензим» [2] та НВП «Аріадна» [3].

За зовнішнім виглядом Біфідумбактерин представляє собою кристалічний чи пористий порошок різних відтінків біжового кольору зі специфічним смаком і запахом. При розчиненні у воді цей препарат утворює однорідну суміш сірувато-біжового кольору.

За своїм призначенням цей препарат відноситься до харчових добавок і застосовується в медицині як засіб для боротьби з діареєю, що містить корисні мікроорганізми. Його терапевтична дія обумовлена наявністю живих біфідобактерій у складі.

Фармакологічні властивості Біфідумбактерину спрямовані на лікування та профілактику кишкових розладів, що виникають через порушення мікрофлори, а також діатезу, алергічних реакцій, функціональних розладів кишківника та наслідків антибактеріальної терапії. Біфідумбактерин демонструє значну протидію шкідливим та потенційно шкідливим мікроорганізмам.

Ключові корисні властивості препарату включають [1]: нормалізацію функціонування травного тракту, оптимізацію роботи системи травлення, а також зміцнення загальної опірності організму до різних чинників.

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ</b>					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Ющенко Н.О.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБІОТИКА БІФІДУМБАКТЕРИНА					
Перевір.		Старовойтова С.О.						Літ.	Арк.	Акрюшів
Реценз.									9	81
Н. Контр.								Кафедра БТМ 9		
Затверд.		Стабніков В.П.								

## РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

### 2.1. Обґрунтування вибору *Bifidobacterium bifidum*

Для промислового виготовлення Біфідумбактерину застосовується біфідобактерія виду *Bifidobacterium bifidum*. Цей мікроорганізм ефективно використовується як для відновлення нормального балансу мікрофлори кишечника, так і для лікування діареї [1].

Бактерії роду *Bifidobacterium* – це грампозитивні й анаеробні мікроорганізми, що швидко колонізують товстий кишківник немовлят при годуванні грудьми, а також головні ферментативні бактерії, що мають комерційний та науковий інтерес. Біфідобактерії характеризуються широким спектром оздоровчих ефектів: вони допомагають у запобіганні та лікуванні порушень роботи шлунково-кишкового тракту, зменшують прояви непереносимості лактози, створюють захисний бар'єр проти хвороботворних мікроорганізмів, підтримують імунітет та можуть відігравати роль у профілактиці онкологічних захворювань.

До того ж із проведенням досліджень із декількома експериментальними моделями *in vitro* та *in vivo* було показано біобезпеку та переваги використання бактерій роду *Bifidobacterium*. До корисних властивостей також належать: укріплення клітинного бар'єру кишечника, регуляція імунної відповіді в кишкового тракту, вироблення речовин з антимікробною дією, а також здатність запобігати розвитку ожиріння та алергічних реакцій. При виборі оптимального штаму-продуцента було проведено аналіз та порівняння найефективніших штамів, що часто використовуються у наукових дослідженнях [4].

					НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ющенко Н.О.			РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Акрівшів
Перевір.		Старовойтова С.О.					10	81
Реценз.						Кафедра БТМ 10		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

– Основними характеристиками, за якими обирають штам-продуцент для виробництва Біфідумбактерину, є такі його властивості, що гарантують потрібну терапевтичну дію препарату:

– життєздатність і стабільність (стійкість до дії високих температур, кислот та ін.);

– адгезія, тобто здатність прикріплюватися до клітин кишківника для більш ефективної колонізації;

– антагоністична активність (здатність пригнічувати ріст умовно-патогенної мікрофлори);

– антибіотикорезистентність;

– доступність (економічна вигідність та ефективність штаму).

Звичайно, серед усіх мікроорганізмів, які використовуються для виготовлення препарату «Біфідумбактерин», зазначеним вимогам відповідають усі штами, що відносяться до роду *Bifidobacterium* [1].

Таблиця 2.1

### Порівняльна характеристика продуцентів пробіотика Біфідумбактерина

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація продукту КУО/мл	Кількість біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Особливості процесу біосинтезу	Література
<i>Bifidobacterium amima</i> lis subsp. <i>lactis</i> BV 1 BM	Триптон – 23; соевий пептон – 16; дріжджовий екстракт – 12; MgSO <sub>4</sub> – 0,25; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2,5; аскорбінова кислота – 0,5; глюкоза – 45.	5,3×10 <sup>10</sup>	7	21	Ферментацію проводили при постійній температурі 42°C, рН – 4,8.	Pat 9504711 USA. Zincenriched biomass, method for the preparation thereof and probiotic, cosmetic, dietary and nutraceutical products comprising the same /Benedetti A., Cernusco Sul Navigli (IT); Girardo F., Orbassano (IT). Publ. Nov. 29, 2016 [5].
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BGN4	Сахароза – 50; соевий пептон – 10; яловичий екстракт – 10; дріжджовий екстракт – 20; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 10; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 5; цитрат амонію – 2; малеїнова кислота – 0,1; MnSO <sub>4</sub> – 0,05; FeSO <sub>4</sub> – 0,1; L-цистеїн – 0,5; твін-80 – 1 мл.	3×10 <sup>9</sup>	4,5	25	Культивування проводили в 5 л біореакторі при 37 °C і 200 об/хв. Біореактор безперервно барботували газовою сумішшю при 0,02 vvm. Початковий рН становив рН 6,8.	Kwon, S. G., Son, J. W., Kim, H. J., Park, C. S., Lee, J. K., Ji, G. E., & Oh, D. K. (2006). High concentration cultivation of <i>Bifidobacterium bifidum</i> in a submerged membrane bioreactor. <i>Biotechnology progress</i> , 22(6), 1591–1597. <a href="https://doi.org/10.1021/bp060236s">https://doi.org/10.1021/bp060236s</a> [6].
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 1	Глюкоза – 25; пептон – 5; дріжджовий екстракт – 10; MgSO <sub>4</sub> – 0,05; MnSO <sub>4</sub> – 0,02.	2,5×10 <sup>9</sup>	4,14	24	Культивування проводили при рН 6, об'єм інокулята становив 1 % (об'єм/об'єм), t = 37°C	Hussain, S. M., Naik, M., Arbaaz Ahmed, L., Udipi, M., & Sukumaran, S. K. (2020). Bioprocess Development for Enhanced Production of Probiotic <i>Bifidobacterium bifidum</i> . <i>Current Science</i> , 118(2), 280. <a href="https://doi.org/10.18520/cs/v118/i2/280-285">https://doi.org/10.18520/cs/v118/i2/280-285</a> [7].

Оцінюючи данні наведені в таблиці 2.1, можна відмітити, що всі продуценти мають приблизно однаковий час культивування від 21 до 25 год.

*Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB 1 VM та *Bifidobacterium bifidum* BGN4 мають найбільші концентрації клітин, які накопичуються протягом 21 год та 25 год культивування, відповідно ( $5,3 \times 10^{10}$  та  $3 \times 10^9$  КОЕ/мл). Але до складу поживних середовищ цих продуцентів, входять достатньо дорогі компоненти, які можуть підвищувати вартість всього процесу виробництва пробіотика Біфідумбактеріна.

Також в таб. 2.1 також представлений ще один продуцент - *Bifidobacterium bifidum* 1. Тривалість культивування цього мікроорганізму становить 24 год, при цьому маючи в складі поживного середовища достатньо дешеві компоненти, що здешевлюють процес ферментації. Тому доцільним буде порівняти вартості поживних середовищ продуцентів, щоб визначити найекономічніший варіант.

Дані про вартість поживних середовищ заявлених продуцентів наведено в таблиці 2.2.

## Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів

Продуцент	Компоненти поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> BB 1 BM	Триптон – 23	20032	460,7	1
	соєвий пептон – 16	1530	24,48	2
	дріжджовий екстракт – 12	1800	21,6	3
	MgSO <sub>4</sub> - 0,25	18	0,004	4
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 2,5	101	0,25	5
	аскорбінова кислота - 0,5	290	0,14	6
	глюкоза – 45	47	2,11	7
<b>Вартість 1 л середовища – 509,3 грн</b>				
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BGN4	Сахароза – 50	110	5,5	8
	соєвий пептон – 10	1530	15,3	2
	яловичий екстракт – 10	7296	72,96	9
	дріжджовий екстракт – 20	1800	36	3
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 10	198	1,98	10
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 5	198	0,99	11
	цитрат амонію – 2	450	0,9	12
	малеїнова кислота – 0,1	500	0,05	13
	MnSO <sub>4</sub> - 0,05	39	0,001	14
	FeSO <sub>4</sub> - 0,1	30	0,002	15
	L-цистеїн – 0,5	780	0,39	16
	твін-80 – 1 мл	82	0,082	17
<b>Вартість 1 л середовища – 134,2 грн</b>				
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 1	Глюкоза – 25	47	1,17	7
	пептон – 5	1120	5,6	18
	дріжджовий екстракт – 10	1800	18	3
	MgSO <sub>4</sub> - 0,05	18	0,0009	4
	MnSO <sub>4</sub> - 0,02	39	0,0007	14
<b>Вартість 1 л середовища – 24,7 грн</b>				

**Примітка:** ціни наведено станом на червень 2024 року: 1 - <https://shop.hlr.ua/ua/pepton-tripton-dmikrobiologii-pankreaticheskiy-gidrolizat-kazeina-500-g-233741.html> ; 2 - <https://www.systopt.com.ua/item-pepton-osnovnyj> ; 3 - <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html> ; 4 - <https://agrosupermarket.com.ua/ua/p76248259-sulfat-magniya-magnij.html> ; 5 - <https://megachem.com.ua/ua/kalij-fosfornokislyj-tehnicheskij.html> ; 6 - <https://prom.ua/ua/p808443922-askorbinovaya-kislota.html?token=v2> ; 7 - <https://snabhim.com.ua/uk-ua/glyukoza> ; 8 - <https://prom.ua/ua/p5251530-saharozha.html> ; 9 - <http://lab-mir.com/index.php/%D0%BA%D0%B0%D1%82%D0%B0%D0%BB%D0%BE%D0%B3/%D0%BF%D0%B8%D1%82%D0%B0> ; 10 - [https://prom.ua/ua/p1133576827-natrij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?token=v2%3AtB2crRSzDIjKi2891CImxvF\\_IJ9XJVFimfHM2IeaFU2WrglVoxg1lSGnUTQd\\_bQv4vbVLIJO6u](https://prom.ua/ua/p1133576827-natrij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?token=v2%3AtB2crRSzDIjKi2891CImxvF_IJ9XJVFimfHM2IeaFU2WrglVoxg1lSGnUTQd_bQv4vbVLIJO6u) ; 11 - <https://prom.ua/ua/p1133576827-natrij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?token=v2%3AoZYxm6X8KlqIWepY4IMfsg85-S98QZsYnktsYHw.IJ8ZZWJVEymd-> ; 12 - [https://prom.ua/ua/p1307940651-ammonij-limonnokislyj-zameschennyj.html?token=v2%3Ag-K5CVFN-3fQ6zpD7dMXL0hysKtlBYEmzk3Iz0Hnm7WCqirK1ijL8pGhdLVEEQHa03\\_2HF-](https://prom.ua/ua/p1307940651-ammonij-limonnokislyj-zameschennyj.html?token=v2%3Ag-K5CVFN-3fQ6zpD7dMXL0hysKtlBYEmzk3Iz0Hnm7WCqirK1ijL8pGhdLVEEQHa03_2HF-) ; 13 - <https://prom.ua/ua/p619258974-maleinovaya-kislotsis-butendiovaya.html> ; 14 - <https://megachem.com.ua/sulfat-marganca.html> ; 15 - <https://prom.ua/ua/p76269158-sulfat-zheleza-zheleznyj.html> ; 16 - [https://prom.ua/ua/p2289381182-aminokislota-tsistein-gidrohlorid.html?token=v2%3AYxbWyqaB2p4TVghOtMZYdyLaB877Ku54DEll\\_ga\\_1lgPInvH54ziVn8T-CR191xQT1dtKKnt-pW9DEB-Fv6Y3y740fASqOSxYSCUuNoMWPoEiGa-](https://prom.ua/ua/p2289381182-aminokislota-tsistein-gidrohlorid.html?token=v2%3AYxbWyqaB2p4TVghOtMZYdyLaB877Ku54DEll_ga_1lgPInvH54ziVn8T-CR191xQT1dtKKnt-pW9DEB-Fv6Y3y740fASqOSxYSCUuNoMWPoEiGa-) ; 17 - <https://megachem.com.ua/ua/tvin-80.html> ; 18 - <https://shop.hlr.ua/pepton-fermentativnyy-pan-gis-12817.html> .

Порівнюючи ціни поживних середовищ, можна дійти висновку, що менш вартісним є культивування *Bifidobacterium bifidum* 1, яке коштує 24,7 грн/л, а найдорожчим *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB 1 VM – 509,3 грн. Але, щоб остаточно порівняти та впевнитися у виборі продуцента порахуємо умовну вартість 1 г пробіотику.

Таблиця 2.3

### Умовна вартість 1 г пробіотику

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Кількість цільового продукту, г/л	Умовна вартість по біомасі г/грн на 1 л середовища	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного пробіотику на годину, г/год
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> BB 1 VM	509,6	7	72,8	21	0,33
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BGN4	134,2	4,5	29,8	25	0,18
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 1	24,7	4,14	5,96	24	0,17

На основі проаналізованих даних, оптимальним вибором для виробництва пробіотичного препарату є штам *Bifidobacterium bifidum* 1, оскільки він має найнижчу умовну вартість виробництва (0,14 грн) серед усіх розглянутих продуцентів та найкоротший період культивування (12 годин). Ці показники підтверджують, що *Bifidobacterium bifidum* 1 є найбільш економічно доцільним штамом для промислового виготовлення пробіотичного препарату.

## 2.2. Таксономічний статус

*Bifidobacterium bifidum* відноситься до 2-ї категорії (грампозитивні бактерії з клітинною стінкою) та до 20-ї групи (грампозитивні палички неправильної форми, що не утворюють спор). Відповідно до аналізу будови 16S генів рибосомної РНК, було наведено наступну таксономічну характеристику *Bifidobacterium bifidum*, що висвітлена у табл. 2.4 [8].

**Таксономічна характеристика *Bifidobacterium bifidum* згідно з аналізом будови 16S генів рибосомної РНК [8]**

Домен	Бактерії
Тип	Firmicutes
Клас	Actinobacteria
Порядок	Bifidobacteriaceae
Рід	<i>Bifidobacterium</i>
Вид	<i>Bifidobacterium bifidum</i>

### 2.3. Морфолого-культуральні ознаки

*Bifidobacterium bifidum* має специфічні морфологічні та культурні ознаки, які проявляються під час вирощування на середовищі Біфідум. Ці бактерії представлені грампозитивними, нерухомими паличками, що мають зігнуту або дугоподібну форму.

При культивуванні на середовищі Біфідум колонії *Bifidobacterium bifidum* демонструють специфічні особливості. Вони зазвичай мають невеликий розмір, у межах 2–3 мм у діаметрі, а також утворюють опуклі, гладкі та блискучі структури.



Рис. 2.1. Морфологія клітин *Bifidobacterium bifidum*

Колір колоній може змінюватися від білого до світло-кремового, що надає їм характерного вигляду на поживному середовищі. При детальному огляді

видно, що їхні краї зазвичай рівні, але інколи можуть бути злегка хвилястими або нерівними.

Форма колоній варіюється — вони можуть бути округлими, неправильної форми або навіть зіркоподібними. Поверхня залишається гладкою та блискучою, що робить їх легко впізнаваними. У середовищі Біфідум бактерії демонструють інтенсивне зростання за умови дотримання оптимальних параметрів: анаеробного середовища та температури 37°C [9].



Рис. 2.2. Колонії біфідобактерій, на твердому живильному середовищі

#### **2.4. Фізіолого-біохімічні ознаки**

*Bifidobacterium bifidum* є хемоорганотрофами за типом живлення, і їхньою основною особливістю є здатність ферментувати різні вуглеводи. Зокрема, ці бактерії ферментують глюкозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, галактозу, рафінозу та мелібіозу, при цьому утворюються молочна та оцтова кислоти без виділення вуглекислого газу. Енергетичний метаболізм цих бактерій здійснюється шляхом гетероферментативного бродіння [1].

Механізм зброджування вуглеводів за участю *Bifidobacterium bifidum* здійснюється за фруктозо-6-фосфатним шляхом. Також ці бактерії є облігатними анаеробами, у зв'язку з чим вони можуть рости лише при низькому окисно-відновному потенціалі середовища.

*Bifidobacterium bifidum* не здатні утворювати каталазу та  $H_2S$  і у них відсутня здатність відновлювати нітрати до нітритів і розріджувати желатину, а також уреазна активність. Для нормального росту та розвитку цих мікроорганізмів є необхідним ряд таких хімічних елементів, як залізо, мідь, калій, натрій, йод, фосфор, магній, сірка і марганець.

Клітинна стінка *Bifidobacterium bifidum*, як правило, містить різні відновлюючі цукри та залишки галактози. Оскільки основні антигени цих бактерій знаходяться саме в їхній клітинній стінці, то її склад напряду пов'язаний з антигенними властивостями подібних мікроорганізмів [10].

*Bifidobacterium bifidum* можуть відмінно конкурувати з патогенними видами мікроорганізмів за колонізацію слизової оболонки кишківника, модулюючи проникність епітеліальних бар'єрів, а також змінювати активність імунних клітин. Ці бактерії розмножуються шляхом формування поперечних перегородок у клітині, що призводить до утворення ланцюгів клітин [1].

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

### 3.1 Потреба населення України в Біфідумбактерині

Біфідобактерії, які природно містяться в мікробіомі товстого кишечника, складають приблизно 25% усіх бактерій у дорослих і до 80% у немовлят. Завдяки своїм пробіотичним властивостям ці бактерії досліджували для профілактики та лікування різних шлунково-кишкових розладів у людини [11].

У разі гострих кишкових захворювань потреба в Біфідумбактерині є особливо актуальною. Частою причиною цих захворювань стає порушення балансу корисної мікрофлори кишечника. Інфекції, спричинені бактеріями, вірусами або паразитами, значно знижують рівень біфідобактерій, які відповідають за нормальне травлення. Крім того, для лікування кишкових інфекцій раніше застосовуються антибіотики, які знищують не тільки збудники хвороби, але й корисну мікрофлору, що викликає дисбактеріоз.

За даними МОЗ України, опублікованими в Щорічному звіті про стан здоров'я населення та епідемічну хворобу [12], у 2022 році було зареєстровано 19905 випадків гострих кишкових інфекцій та 15967 випадки ентеритів, колітів, гастроентеритів та харчових токсикоінфекцій, спричинених інсталюваними збудниками. Точних даних, щодо вікової категорії хворих не було надано, тому для подальшого розрахунку приймемо, що частка дорослих становила – 60%, а дітей молодше 12 років – 40 %. Отже загальна кількість дорослих та дітей, яким показаний прийом пробіотика становить 21523 та 14349 осіб відповідно.

Згідно інструкції [13] дітям з 3-х до 12-ти років показаний прийом по одному флакону 2 рази на добу, а дорослим і дітям старше 12-ти років - по 2 флакона 2-3 рази на добу. Рекомендований термін вживання - 20 днів.

					НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Юценко Н.О.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Старовойтова С.О.					18	81
Реценз.						Кафедра БТМ 18		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Один флакон Біфідумбактерина містить 0,5 г порошку в якому не менше  $10^7$  живих біфідобактерій [13]. Також потрібно врахувати, що в склад препарату входять допоміжні речовини: сахароза - від 7 до 10%, желатин харчовий - від 0,7 до 1,0%, молоко знежирене - від 15 до 25%, то вміст потрібної нам культури становить приблизно 0,3 г *Bifidobacterium bifidum*.

Для зручності розрахунків потреби в Біфідумбактерині на курс лікування для населення України, занесена в таблицю 3.1.

Таблиця 3.1

**Рекомендована кількість Біфідумбактерина для лікування гострих інфекційних захворювань для дітей та дорослих**

Вікова категорія	Кількість хворих	Доза препарату, г	Кількість прийомів на добу, фл.	Курс лікування	Кількість препарату, кг
Діти 3-х до 12 років	14349	0,3	2	20 днів	172,2
Дорослі та діти старше 12 років	21523	0,3	4	20 днів	516,5
<b>Всього:</b>					<b>688</b>

Округлимо значення до 700 кг пробіотика на рік.

**3.2. Розрахунок потужності виробництва Біфідумбактерина**

На українському ринку представлений широкий асортимент пробіотиків, серед яких популярні препарати як іноземного, так і українського виробництва. деякі ці препарати містять корисні штамми бактерій, такі як *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces boulardii* та інші, що сприяють відновленню мікрофлори кишківника та зміцненню імунної системи.

## Перелік пробіотичних препаратів, представлених на українському ринку

Країна-виробник	Препарат	Вид (штам)	Дозування, КУО	Форма випуску	Виробник
Україна	Лактіале (Lactiale)	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	1×10 <sup>8</sup> КУО на капсулу	Капсули, порошок	Фармак
Швеція	Біогая (BioGaia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Protectis</i>	100 млн КУО	Краплі, таблетки	BioGaia AB
Франція	Ентерол (Enterol)	<i>Saccharomyces boulardii</i>	не менше 2×10 <sup>9</sup> КУО	Капсули, порошок	Біокодекс
Словенія	Лінекс (Linex)	<i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Enterococcus</i>	1,2-2 млрд КУО	Капсули	Сандоз
Україна	Симбітер	Комплексні штами <i>Lactobacillus</i> та <i>Bifidobacterium</i>	1-5 млрд КУО	Рідина, порошок	Інститут мікробіології
Україна	Біфідумбактерин	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	не менше 1×10 <sup>7</sup> КУО	Порошок, капсули	ТОВ Віво-Актив
Україна	Наріне	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1-3 млрд КУО	Капсули, порошок	Артлайф Україна
США	Пробіофлора (ProBioFlora)	Комплексний симбіотик	5-10 млрд КУО	Капсули	Now Foods
Україна	Йогуртні культури	Комплексні штами кисломолочних бактерій	1-3 млрд КУО	Порошок для йогурту	Виробники кисломолочної продукції

З таблиці можна зробити висновок, що Біфідумбактерин, хоча й відомий пробіотик, але не є незамінним на українському ринку. Існує значна кількість альтернативних препаратів українського та західного виробництва, які мають подібні пробіотичні властивості. Препарати, що утворюють *Bifidobacterium* (такі

як Симбітер, Лактіале, Лінекс), покривають потребу в препаратах біфідобактерій. Отже частка українських виробників становить приблизно 55%, тобто половина ринку України.

Враховуючи, все вище сказане, пропоную виробляти 5% від загальної потреби. Це обґрунтоване ринковими умовами та наявністю альтернативних пробіотиків, що частково перекривають цей сегмент. Через це новий продукт має зайняти відносно невелику нішу, особливо на старті виробництва. Вибір частки у 5% є оптимальним з точки зору поступового входу на ринок, щоб уникнути надвиробництва і знизити ризики при високій конкуренції.

Отже, потужність виробництва пробіотика Біфідумбактерин становитиме:

$$G_{\text{гп}} = 700 \times 5 / 100 = 35 \text{ кг/рік}$$

Згідно даних статті [4] найбільша кількість живих клітин  $2,5 \times 10^9$  КУО/мл виділяється за 24 години. Для штаму *Bifidobacterium bifidum* 1 концентрація біомаси становить 7 г/л. Щоб розрахувати об'єм культуральної рідини, потрібний для виробництва 40 кг пробіотика, використаємо ці дані:

$$X = 35000 \text{ г} / 7 \text{ г/л} = 5000 \text{ л або } 5 \text{ м}^3$$

Враховуючи, що при виділенні втрачається 10% цільового продукту, потрібно збільшити розрахований об'єм культуральної рідини на відповідну величину:

$$V_{\text{кр}} = 5 \times 0,1 + 5 = 5,5 \text{ м}^3$$

### **3.3 Розрахунок геометричного об'єму ферментера**

Для розрахунку необхідної кількості стадій приготування посівного матеріалу потрібно визначити об'єм культуральної рідини на один цикл ферментації. При 50 робочих днях денний об'єм культуральної рідини обчислюється наступним чином:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{тр}} = 5,5 / 50 = 0,11 \text{ м}^3$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

Загальний цикл роботи ферментера (Тцф) складається з часу виробничого біосинтезу (24 години) та періоду підготовки ферментера (10 годин). При цьому

враховується коефіцієнт запасу ( $K_1 = 1,1 - 1,5$ ), який компенсує можливі нестерильні операції.

Базуючись на цих параметрах та враховуючи коефіцієнт заповнення, можна розрахувати необхідний геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{цк}} / K_3 = 0,17 / 0,8 = 0,21 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий ферментер з стандартним геометричним об'ємом  $0,25 \text{ м}^3$ , тоді дійсний коефіцієнт заповнення становитиме:

$$K_{\text{зф}} = V_{\text{цк}} / V_{\Gamma} = 0,17 / 0,21 = 0,8$$

Дане значення коефіцієнту заповнення, знаходиться в допустимих межах для процесу ферментації, отже, обраний ферментер задовольняє наші вимоги.

### ***3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу***

У процесі виробництва отримують  $V_{\text{кр}} = \text{л}$  ферментаційної рідини. Необхідно взяти до уваги втрати рідини через винесення крапель із відпрацьованим повітрям через повітряний колектор, що складає від 10 до 15% загального об'єму. Таким чином, сумарний об'єм інокуляту та поживного середовища на початку виробничої ферментації становить:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 210 / (1 - 0,15) \approx 247 \text{ л},$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом

$$V_{\text{роб.1}} = 247 \text{ л}.$$

При заданому коефіцієнті заповнення апарату, що знаходиться в діапазоні  $K_{\text{зап}} = 0,8 - 0,85$ , розрахунковий повний геометричний об'єм ферментера ( $V_{\text{ф}}$ ) визначається наступним чином:

$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}} / K_{\text{зап}} = 247 / 0,8 \approx 309 \text{ л}$ . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{сф}} = 300 \text{ л}$ , та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 247 / 300 = 0,82.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення знаходиться в заданих межах, тому обраний геометричний об'єм ферментера є правильним.

Оскільки посівний матеріал становить 10% від об'єму поживного

середовища у ферментері, то об'єм поживного середовища буде:

$V_{пс1} = V_{роб.1}/(1+Xф) = 247/(1+0,1) \approx 224$  л, де  $Xф = 0,1$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 247 - 224 = 23 \text{ л.}$$

Для отримання 23 л посівного матеріалу необхідно врахувати можливі втрати рідини через винесення крапель з відпрацьованим повітрям через повітряний колектор, що складає 10-15%.

Відповідно, загальний об'єм поживного середовища та посівного матеріалу, що має бути завантажений у посівний апарат, розраховується як:

$$V_{роб.2} = V_{пм1}/(1-E_{па}) = 23/(1-0,10) \approx 25,5 \text{ л.}$$

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

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити  $V_{пс2} = V_{роб.2}/(1+X_{па}) = 25,5/(1+0,1) \approx 23$  л, де  $X_{па} = 0,1$  – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 25,5 - 23 = 2,5 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту  $V_{роб.2} = 25,5$  л можна одержати під час культивування дріжджів у посівному апараті

$$V_{па2} = V_{роб.2}/K_{зап} = 25,5/0,8 \approx 32 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} \approx 30$  л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з2} = V_{роб.2}/V_{сф} = 25,5/30 = 0,85.$$

Для отримання 2,5 л посівного матеріалу ( $V_{пм2}$ ) використовується метод культивування в колбах на качалці. При об'ємі качалочних колб 750 мл та коефіцієнті заповнення  $K_{зк} = 0,2$ , необхідна кількість колб розраховується як:

$$N_{колб} = V_{пм2}/(V_{колб} \cdot K_{зк}) = 2500/750 \cdot 0,2 = 16,6 \approx 17 \text{ колб}$$

Таким чином, процес отримання посівного матеріалу для забезпечення виробничої ферментації у апараті об'ємом 300 л (коефіцієнт заповнення 0,82) включає три послідовні етапи, де третій етап - це власне виробничий біосинтез.

Для систематизації даних щодо кількості стадій та відповідних об'ємів при підготовці посівного матеріалу доцільно представити інформацію у вигляді таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

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

Об'єм ферментера, л	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера, л	Об'єм посівного матеріалу (10%), л	Конденсат (10%), л	Об'єм підготовки поживного середовища, л
300	0,8	247	23	23	224
30	0,8	25,5	2,5	2,5	23
2,5	0,8	2,5	0,2	-*	2,5

**Примітка\*:** конденсат не враховано, оскільки стерилізація композицій поживного середовища відбуватиметься у колбах в автоклаві

**3.5. Схема біотрансформації ростового субстрату**

На основі численних ензимологічних досліджень було встановлено особливості метаболізму вуглеводів у *Bifidobacterium bifidum*. Через відсутність ключового ферменту гліколізу - фруктозодифосфатальдолази, основний шлях катаболізму вуглеводів у цих мікроорганізмів відбувається через пентозофосфатний цикл. У процесі метаболізму глюкоза спочатку перетворюється на фруктозо-6-фосфат за гліколітичним шляхом. Далі, за участю специфічних фосфокетолаз, відбувається перетворення фруктозо-6-фосфату на ацетилфосфат та ксилулозо-5-фосфат. В подальшому ксилулозо-5-фосфат метаболізується до ацетилфосфату та гліцеральдегідфосфату [15].

Схема біотрансформації ростового субстрату за участю *Bifidobacterium bifidum* наведена на *рис. 3.1*.

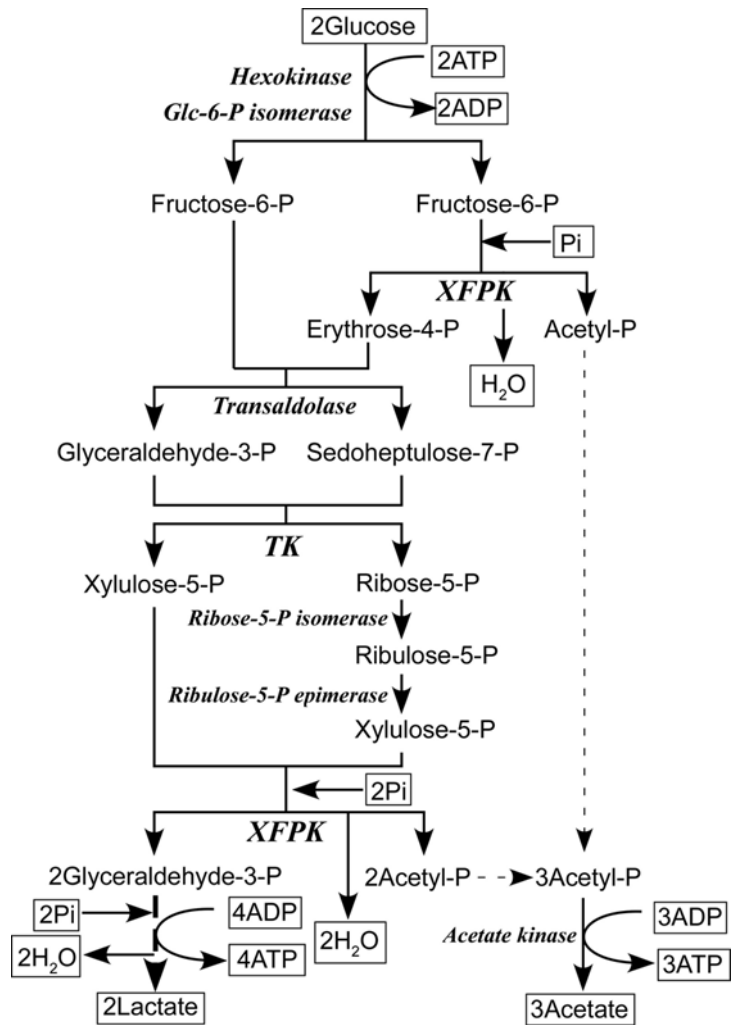


Рис. 3.1. Схема біотрансформації ростового субстрату за участю *Bifidobacterium bifidum* [15].

## РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

### 4.1. Обґрунтування необхідності забезпечення анаеробного культивування

Оскільки біфідобактерії є анаеробами, вони розмножуються та функціонують в умовах відсутності кисню. У процесі культивування анаеробних бактерій, таких як *Bifidobacterium*, кисень не лише не потрібний, але й може пригнічувати їхній ріст або навіть викликати загибель клітин.

Відсутність потреби в подачі повітря спрощує конструкцію ферментера, зменшуючи кількість необхідного обладнання та витрат енергії. Окрім цього, немає потреби використовувати піногасник, оскільки без подачі повітря утворення піни зазвичай мінімальне, а надлишок піни може негативно впливати на якість середовища і спричиняти додаткові ускладнення під час виробничого процесу. Отже, подача повітря для аерації не потрібна, проте необхідне застосування інертного газу для забезпечення максимальної відсутності кисню під час культивування. Для цього у ферментер подають азот, який витісняє залишки повітря. Перед подачею з балонів азот проходить через фільтр із розміром пор не більше 0,2 мкм, що дозволяє видалити можливі мікроорганізми-контаміанти, які можуть у ньому міститися [16].

Стерильне аераційне повітря потрібне в анаеробному культивуванні для запобігання контамінації посівного матеріалу, тому в технології виробництва необхідно передбачити стадію підготовки аераційного повітря.

					НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Юценко Н.О.			РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрів
Перевір.		Старовойтова С.О.					26	81
Реценз.						Кафедра БТМ 26		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Першим етапом є забір атмосферного повітря. Цей процес реалізується через забірну шахту з використанням турбокомпресора. Етап проводиться на висоті 2-3 метри від найвищої точки споруди, що становить приблизно 16 метрів, беручи до уваги висоту поверху (6 м), кількість поверхів (2), та нахил даху (близько 1,5 м).

Другий етап – проходження повітря через фільтри попереднього очищення. Попередні фільтри, які іноді називають фільтрами грубого очищення, призначені для уловлювання великих часток, таких як пил. В якості фільтрів попереднього очищення можна використати також губчаті фільтри з модифікованого пінополіуретану [36].

Третій етап – стиснення повітря. Далі повітря піддається стисненню в турбокомпресорі, де цей процес відбувається завдяки відцентровій силі. Ці апарати є складнішими в обслуговуванні, але забезпечують високу продуктивність (від 100 до 1000 м<sup>3</sup>/хв) і не забруднюють повітря маслом [18].

Четвертий етап - охолодження стисненого повітря за допомогою теплообмінного апарату.

П'ятий етап - підігрів повітря у теплообмінниках.

Шостий етап - видалення зайвої вологи відбувається за допомогою ресивера. Протягом цього етапу також проходить процес вирівнювання тиску попередньо очищеного повітря [17].

Сьомий етап - очищення повітря на головних фільтрах. Відповідний етап дозволяє досягти видалення до близько 98% можливих мікроорганізмів. У практиці очистки повітря волокнисті матеріали набули значного поширення як фільтрувальні елементи головних фільтрів. На відміну від поверхневих фільтрів, волокнисті фільтри працюють за принципом об'ємної фільтрації, що дозволяє затримувати та накопичувати частинки не лише на поверхні фільтрувального матеріалу, але й у товщі фільтрувального шару [18].

#### ***4.2. Обґрунтування способу приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу***

Для вирощування *Bifidobacterium bifidum* 1 з метою одержання Біфідумбактерину планується використати поживне середовище наступного складу (г/л):

- Декстроза моногідрат – 25;
- пептон – 5;
- дріжджовий екстракт – 10;
- $MgSO_4$  - 0,05;
- $MnSO_4$  - 0,02.

Для приготування поживного середовища всі його водорозчинні компоненти потрібно розчинити разом у дистильованій воді, а саме декстрозу моногідрат та тому що їх можна стерилізувати при одному температурному режимі. Пептон також потребує попереднього розчинення у воді, але його необхідно готувати окремою композицією, так як він має інший температурний режим для стерилізації.

Також в поживному середовищі присутні магнію сульфат та сульфат марганцю. Ці солі також можна розчиняти разом, так як при розчиненні вони не будуть утворювати нерозчинний осад. З представлених у таблиці 2.1 даних можна зробити висновок щодо особливостей підготовки поживного середовища на різних етапах культивування. На початкових стадіях, а саме при вирощуванні посівного матеріалу в колбах на качалках та в 25-літровому інокуляторі, необхідно використовувати концентрований розчин мікроелементів. Цей розчин готується з розрахунку 1 г кожної солі на 100 мл розчину та додається у кількості 0,1 мл на кожні 100 мл середовища. При подальшому масштабуванні процесу на наступних стадіях допускається внесення мікроелементів разом з іншими сольовими компонентами середовища.

Таблиця 4.1

**Розрахунок вмісту мікроелементів у різних об'ємах поживного середовища**

Об'єм середовища, л	Вміст мікроелементів	
	$MgSO_4$	$MnSO_4$
2,5	0,125 г	0,05 г

#### **4.2.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту у флаконі**

Базуючись на аналізі складу поживного середовища для культивування посівного матеріалу *Bifidobacterium bifidum* 1, компоненти розділено на окремі композиції відповідно до необхідних режимів стерилізації:

У **композицію А** входять декстроза моногідрат, дріжджовий екстракт та пептон, які стерилізують за помірних умов (112 °С, 0,05 МПа, 30 хв) через їх термолабільність.

Для солей магнію сульфату та марганцю сульфату готується окремий запасний розчин мікроелементів, який піддається стерилізації за стандартним температурним режимом для сольових розчинів. Стерилізацію всіх компонентів проводять в автоклаві.

Детальні розрахунки кількостей компонентів, необхідних для приготування поживного середовища при вирощуванні посівного матеріалу у флаконі, представлені в таблиці 4.2.

*Таблиця 4.2*

#### **Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу у флаконі**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 2,5 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Декстроза моногідрат	25	625	А	2
Дріжджовий екстракт	10	62,5		
Пептон	5	2,5		
Вода		2 л		
Р-н мікроелементів		0,5 л		0,5
Разом		2 5		2 5

#### **4.2.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах**

##### **Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 30 л**

На основі аналізу складу поживного середовища для культивування посівного матеріалу *Bifidobacterium bifidum* 1 здійснено розподіл компонентів на дві композиції з різними режимами стерилізації:

**Композиція А** включає декстрозу моногідрат, дріжджовий екстракт та пептон. Ці компоненти стерилізуються за режиму 112 °С, 0,05 МПа протягом 30 хвилин у реакторі-змішувачі.

**Композиція Б** містить сольові компоненти - MgSO<sub>4</sub> та MnSO<sub>4</sub>, які стерилізуються безпосередньо у посівному апараті при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа протягом 40 хвилин.

Точні розрахунки кількостей усіх необхідних компонентів для приготування поживного середовища при культивуванні посівного матеріалу в 30-літровому посівному апараті наведені у таблиці 4.3.

*Таблиця 4.3*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 25,5 л поживного середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 25,5 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Декстроза моногідрат	25	637,5	А	15,5
Дріжджовий екстракт	10	255		
Пептон	5	127,5		
Вода		13,95 л		
Конденсат		1,55 л		
MgSO <sub>4</sub>	0,05	1,275	Б	10
MnSO <sub>4</sub>	0,02	0,51		
Вода		9 л		
Конденсат		1		
Разом		25,5		25,5

**4.2.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 300 л**

При аналізі складових компонентів поживного середовища для біосинтезу *Bifidobacterium bifidum* 1 виділено **композицію А**, яка містить термолабільні сполуки - декстрозу моногідрат, дріжджовий екстракт та пептон. Враховуючи чутливість цих компонентів до високих температур, для їх стерилізації застосовується помірний режим: температура 112 °С, тиск 0,05 МПа, тривалість 30 хвилин.

При виробничому біосинтезі *Bifidobacterium bifidum* 1 композиція Б, що містить сольові компоненти (MgSO<sub>4</sub> та MnSO<sub>4</sub>), стерилізується при підвищених параметрах - температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа протягом 40 хвилин. Процес

стерилізації композиції А (термолабільні компоненти) проводиться у реакторі-змішувачі, тоді як композиція Б проходить стерилізацію безпосередньо у виробничому ферментері.

Детальні розрахунки необхідних кількостей всіх компонентів поживного середовища для проведення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 300 л представлені в таблиці 4.4.

Таблиця 4.4

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 247 л поживного середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 247 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Декстроза моногідрат	25	6175	А	150
Дріжджовий екстракт	10	2470		
Пептон	5	1235		
Вода		135 л		
Конденсат		15 л		
MgSO <sub>4</sub>	0,05	13,35	Б	97
MnSO <sub>4</sub>	0,02	4,94		
Вода		87,3 л		
Конденсат		9,7 л		
Разом		247		247

**4.3. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН**

Під час біосинтезу біфідобактерій титрувальні агенти, зокрема аміачна вода, використовуються для стабілізації рН середовища. Біфідобактерії продукують молочну кислоту, що поступово знижує рН культурального середовища, ускладнюючи умови для їхнього росту. Щоб нейтралізувати молочну кислоту та підтримати оптимальний рН, зазвичай застосовують аміачну воду (25%-й розчин NH<sub>4</sub>OH), яка ефективно підлужнює середовище завдяки високій концентрації аміаку.

Важливим етапом є стабілізація рН на рівні, необхідному для життєдіяльності біфідобактерій, що досягається шляхом періодичного додавання аміачної води у міру утворення кислоти. Орієнтовні витрати титрувального агенту становлять 30 мл 25%-го розчину аміаку на 1 л культуральної рідини, що дозволяє ефективно компенсувати кислотність і забезпечити стабільний ріст бактерій без ризику пригнічення через підвищену кислотність.

## РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 5.1

### Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ – 1	Повітрозбірник	1	<p>Повітрозбірник                      Тиск ударної хвилі, кгс/см<sup>2</sup> до 10                      Діаметр отвору під повітровод, мм 200                      Маса, кг, не більше 12                      Виробник: Україна  <a href="https://ccktm.prom.ua/ua/p1766406511-korobka-dlya-ustanovki.html">https://ccktm.prom.ua/ua/p1766406511-korobka-dlya-ustanovki.html</a></p>
Ф – 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	<p>Фільтруючий матеріал – поліестер, швидкість фільтрування 3 м<sup>3</sup>/год,                      E = 80 %.  <a href="https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/filtruyuchiy-material-g4.html">https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/filtruyuchiy-material-g4.html</a></p>
К – 3	Компресор	1	<p>Компресор серії «ВКП F Industrial» .Кількість циліндрів/ступенів стиснення 2/2                      Продуктивність, вхід л/хв 500                      Продуктивність, вихід л/хв: 330                      Тиск нагнітання (мах), атм 10                      Потужність приводного електродвигуна, кВт 3,0                      Напруга живлення, 380                      Маса (кг) 122                      Виробник: Україна  <a href="https://kompressor.kiev.ua/katalog/porshnevye-kompressory/vkp-f-seriya-industrial76/kompressor-vkp-f-ab-515-10-200.html">https://kompressor.kiev.ua/katalog/porshnevye-kompressory/vkp-f-seriya-industrial76/kompressor-vkp-f-ab-515-10-200.html</a></p>

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Ющенко Н.О.					32	81
Перевір.		Старовойтова С.О.				Кафедра БТМ 32		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ТО – 4	Теплообмінник-охолоджувач	1	<p>Максимальний робочий тиск: 155°C  Первинний контур: 31 бар  Вторинний контур: 31 бар  Мінімальна робоча температура: -196°C  Максимальна робоча температура: 225°C  Максимальна витрата через теплообмінник: 12 м<sup>3</sup>/год  Вага нетто: 1.5+0.116хNP кг  Матеріал припою: Чиста мідь чи нікель  Виконання підключень: різьбове, паяння, зварювання  Виробник: Швеція  <a href="https://termoprom.com.ua/teploobmenniki/po-tipu/plastinchatye-teploobmenniki/plastinchatyy-teploobmennik-swep-b10thx20">https://termoprom.com.ua/teploobmenniki/po-tipu/plastinchatye-teploobmenniki/plastinchatyy-teploobmennik-swep-b10thx20</a></p>
Р – 5	Ресивер	1	<p>D: 1220 мм  H: 3250  Вага: 1200 кг  Ємність: 3000 л  Максимальний робочий тиск: 30 бар  Під'єднання: 2"  Робоча температура: -20/50 °С Країна виробник: Україна  <a href="https://pneumatyka.com.ua/products/zbiornik-sprezonego-powietrza-3000l-30bar/">https://pneumatyka.com.ua/products/zbiornik-sprezonego-powietrza-3000l-30bar/</a></p>
ТН – 6	Теплообмінник-нагрівач	1	<p>Кількість повітря, м<sup>3</sup>/год: 7500  Необхідна теплова потужність, кВт (від –100С до +200С): 80 кВт  Виробник: Україна  <a href="https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php">https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php</a></p>
Ф – 7	Фільтр тонкої очистки	1	<p>Модель фільтра FMW.  Матеріал: мікроскловолокно  Ступінь очищення повітря 99%. Продуктивність фільтра складає 3400 м<sup>3</sup>/год  Виробник: Україна  <a href="https://tehnofilter.ub.ua/ru/goods/view/6364274/all/filtr-tonkoy-ochistki-vozduha-ftov-hepa-hepa/">https://tehnofilter.ub.ua/ru/goods/view/6364274/all/filtr-tonkoy-ochistki-vozduha-ftov-hepa-hepa/</a></p>
З-8	Збірник	1	<p>Збірник об'ємом 10, оснащений, виготовлений зі сталі AISI 304 . Виробник: Україна  <a href="https://metalis.prom.ua/ua/p2149677394-emkost-nerzhaveyuschej-stali.html">https://metalis.prom.ua/ua/p2149677394-emkost-nerzhaveyuschej-stali.html</a></p>
НВ-9 НВ-12 НВ-15 НВ-18 НВ-21 НВ-28	Насос-відцентровий	6	<p>Циркуляційний насос Grundfos  Насос відцентровий герметичний , матеріал чугун.  Продуктивність від 3,2 м<sup>3</sup> /год, Максимальний тиск – 10бар. Виробник: Данія.  <a href="https://modernsys.com.ua/tsirkulyatsionnyy-nasos-grundfos-ups-25-60-130-19121.html">https://modernsys.com.ua/tsirkulyatsionnyy-nasos-grundfos-ups-25-60-130-19121.html</a></p>

РЗ-10	Реактор-змішувач	1	<p>Модель: Nanbei NB-5L, об'єм: 2,5 л, матеріал: термостійке скло, швидкість перемішування: 0-800 об/хв (виробник: HYDROLIDER) <a href="https://hydrolider.com.ua/ua/p2151988635-steklyannyj-reaktor-rubashkoj.html">https://hydrolider.com.ua/ua/p2151988635-steklyannyj-reaktor-rubashkoj.html</a></p>
Л-9 Л-11 Л-13 Л-15 Л-17	Лічильник	5	<p>Бренд: Gross Довжина: 110 мм Використання лічильника: для води Вид лічильника: крильчастий Тип установки: вертикальний/горизонтальний Гарантія: 30 міс. Країна-виробник: Україна <a href="https://epicentrk.ua/ua/shop/lichylnyk-hariachoi-vody-gross-etr-c-h-15-110-r-50h-40v-bez-zghoniv.html">https://epicentrk.ua/ua/shop/lichylnyk-hariachoi-vody-gross-etr-c-h-15-110-r-50h-40v-bez-zghoniv.html</a></p>
РЗ-10	Реактор – змішувач	1	<p>Реактор-змішувач об'ємом 20. Залежно від запланованих процесів, реактор може бути обладнаний сорочкою нагріву і/або охолодження, теплоізоляцією і комплектуватися різними пристроями: пропеллерними мішалками High Flow для ламінарного перемішування або розчинення сипучих матеріалів в рідинах; пропеллерними мішалками INTERMIG для ламінарного перемішування і кристалізації матеріалів; якорна мешалка зі скребками для ламінарного перемішування і зняття придонного шару; гомогенізатор (дисольвер) - для інтенсивного, кавітаційного перемішування і гомогенізації матеріалів; донна пропелерна мішалка з магнітною муфтою для перемішування рідин з підвищеними вимогами до санітарії. Виробник: Україна. <a href="https://ukrchemgroup.com/ua/p1331234280-steklyannyj-himicheskij-reaktor.html">https://ukrchemgroup.com/ua/p1331234280-steklyannyj-himicheskij-reaktor.html</a></p>
ЗЗ-13	Збірник-змішувач	1	<p>Об'єм: 15 л, матеріал: термостійке скло, швидкість перемішування: 0 - 600 об/хв (Виробник: UkrChemGroup) <a href="https://khimmix.ua/ua/himicheskije-reaktory/laboratornyj-reaktor-15-l">https://khimmix.ua/ua/himicheskije-reaktory/laboratornyj-reaktor-15-l</a></p>
РЗ-16	Реактор – змішувач	1	<p>Збірник-змішувач об'ємом 200, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі AISI 304 . Виробник: Україна <a href="https://perryvidex.eu/product/210-ltr-3-fv-bar-int-3-fv-var-jkt-h3932-1">https://perryvidex.eu/product/210-ltr-3-fv-bar-int-3-fv-var-jkt-h3932-1</a></p>

33-19	Збірник-змішувач	1	Об'єм: 150 л, матеріал: нержавіюча сталь, тип мішалки: якірна (Виробник: ХімМікс) <a href="https://perryvidex.eu/product/142-ltr-1-2-bar-mixing-skid-with-electric-VB0007-149">https://perryvidex.eu/product/142-ltr-1-2-bar-mixing-skid-with-electric-VB0007-149</a>
Б-23	Балон	1	Ємність 40 л, робочий тиск 14,7 МПа, вага балону 65 кг, виготовлений відповідно ГОСТ 949-73 <a href="https://ballongaz.com.ua/p12193426ballonazotnyj40l.html?source=merchant_center">https://ballongaz.com.ua/p12193426ballonazotnyj40l.html?source=merchant_center</a>
ГФ-22	Газовий фільтр	1	Модель: FMC 03 DN15 2 бар, максимальний робочий тиск: 6 бар (виробник: Madas, Італія) <a href="https://akvateh.dp.ua/ua/p1248439582-filtr-gazovyj-kompaktnyj.html">https://akvateh.dp.ua/ua/p1248439582-filtr-gazovyj-kompaktnyj.html</a>
Ф-25 Ф-27	Індивідуальний фільтр очистки повітря	2	Стерилізуючі фільтри Матеріал: політетрафторетилен. Ступінь очищення повітря фільтром становить 99,9999 %. Виробник: Україна. <a href="http://novafilter.tech/products/f%D1%96ltri/steril%D1%96zuyushh%D1%96/dlya-gaz%D1%96v">http://novafilter.tech/products/f%D1%96ltri/steril%D1%96zuyushh%D1%96/dlya-gaz%D1%96v</a>
ІН-24	Інокулятор	1	Об'єм: 30 л, матеріал: нержавіюча сталь, тип мішалки: якірна (Виробник: Techfors-S, Infors) <a href="https://unilab.kiev.ua/catalog/fermentery-i-bioreaktory/FermenteryTechforsSInfors/">https://unilab.kiev.ua/catalog/fermentery-i-bioreaktory/FermenteryTechforsSInfors/</a>
ФР-26	Ферментер	1	Модель: DIN-BE Об'єм: 300 л, матеріал: нержавіюча сталь. Оснащений барботером, сорочкою, датчиками кислотності, кисню та температури, пробовідбірником, манометром, турбінною мішалкою: 320 об/хв. (Виробник: Techfors, Infors) <a href="https://unilab.kiev.ua/catalog/fermentery-i-bioreaktory/FermenteryTechforsInfors/">https://unilab.kiev.ua/catalog/fermentery-i-bioreaktory/FermenteryTechforsInfors/</a>

## РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Виробництво Біфідумбактерину базується на використанні штаму *B. bifidum* 1 та реалізується через три основні етапи виробничого циклу. Технологічна схема охоплює послідовність підготовчих та допоміжних робіт, за якими слідує основний технологічний процес. Завершальним етапом виступає комплекс операцій з відвантаження продукції та знешкодження виробничих відходів.

### *ДР 1. Санітарна підготовка виробництва*

#### *ДР.1.1. Підготовка персоналу*

Для забезпечення якості та безпеки виробництва встановлено комплексні вимоги до персоналу та правила доступу до виробничих приміщень. Кожен працівник зобов'язаний пройти відповідний інструктаж, регулярні медичні обстеження та дотримуватися встановлених стандартів.

З огляду на те, що персонал є основним фактором мікробіологічного ризику, запроваджено суворі правила виробничої гігієни. Працівникам заборонено вносити сторонні предмети до виробничих зон. При виникненні будь-яких симптомів захворювання співробітник повинен негайно інформувати керівництво. Весь виробничий персонал проходить обов'язкове навчання щодо правил та методів дезінфекції перед початком робочої зміни.

Доступ до виробничих приміщень здійснюється виключно через санітарні пропускники. У виробничих зонах дозволено перебувати тільки працівникам, безпосередньо залученим до технологічного процесу. Вхід не виробничого персоналу та сторонніх осіб суворо заборонений. Допуск до виробничих приміщень надається лише особам, які пройшли спеціалізовану підготовку, інструктаж з правил поведінки та відповідну санітарно-гігієнічну обробку.

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрюшів
Розроб.		Ющенко Н.О.					36	81
Перевір.		Старовойтова С.О.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ 36			

## *Навчання персоналу*

Персонал виробництва проходить щорічний інструктаж з вимог роботи на підприємстві, що забезпечує оновлення знань працівників, вдосконалення виробничих процесів та дотримання міжнародних стандартів.

### *Медичний огляд*

Медичний нагляд за працівниками здійснюється відповідно до законодавчих вимог. Згідно зі статтею 169 КЗпП та статтею 17 Закону №2694, роботодавець забезпечує проведення медичних оглядів за власний кошт. Обов'язковими є попередній огляд при працевлаштуванні та періодичні обстеження протягом роботи, включаючи бактеріологічний контроль, що проводяться щонайменше раз на рік або частіше за необхідності.

### *Підготовка одягу*

Виробничий одяг виконує функцію захисного бар'єру між продукцією, виробничим середовищем та персоналом, мінімізуючи ризики забруднення. При залишенні виробничої зони працівники проходять процедуру переодягання. В кожному виробничому приміщенні персонал використовує спеціально передбачений комплект одягу.

Використаний одяг розміщують у спеціально маркованих закритих контейнерах. Особливої уваги потребує одяг персоналу, що працює з живими культурами мікроорганізмів – він підлягає дезінфекційній обробці перед пранням.

Матеріал виробничого одягу має відповідати специфічним вимогам: щільність структури, антистатичні властивості, відсутність ворсу та волокон, вогнестійкість. Для біотехнологічних виробництв оптимальним вибором є захисний одяг з високим вмістом бавовни, що забезпечує відповідність всім зазначеним критеріям.

#### *ДР.1.2. Підготовка дезінфікуючих та миючих засобів*

##### *ДР.1.2.1. Підготовка мийних засобів («Біонол» та каустична сода)*

**Приготування розчину Біонолу** Для отримання 0,15% робочого розчину Біонолу на 10 л потрібно розчинити 15 г засобу в 9,985 л води, що відповідає

нормам ДСанПіН 2.2.4-171-10 [20]. При приготуванні 3% розчину на 10 л використовують 300 г Біонолу та 9,7 л води. Робочі розчини зберігають у маркованій тарі з герметичною кришкою, термін придатності становить 14 діб.

**Приготування розчину NaOH** Для приготування 1-2% розчину NaOH на 1 л використовують 25 мл 42% NaOH. При приготуванні 10 л розчину спочатку наливають 3,250 л теплої води (40-45°C), додають 250 мл 42% NaOH, потім доливають решту води та ретельно перемішують. Ємність щільно закривають кришкою. Термін придатності розчину NaOH - 24 години.

Важливо: для санітарної обробки дозволяється використовувати лише засоби, що пройшли державний контроль та мають відповідні дозвільні документи.

#### *ДР.1.2.2. Підготовка дезінфікуючих засобів для персоналу*

Процедура гігієнічної обробки рук включає декілька послідовних етапів. Першим кроком є попереднє зволоження рук питною водою та нанесення миючого засобу. Миття виконується ретельно, охоплюючи поверхню рук до ліктів, після чого руки ополіскують водою та повністю висушують.

Наступним етапом є нанесення дезінфекційного розчину "Стериліум". Засіб розподіляють по всій поверхні кистей, включаючи внутрішню та зовнішню сторони, міжпальцеві проміжки та навколонігтьові зони. Важливо втирати не менше 3 мл засобу протягом щонайменше 30 секунд для забезпечення належного антисептичного ефекту.

#### *ДР.1.2.3. Підготовка дезінфікуючих засобів для обладнання*

Для дезінфекційної обробки поверхонь обладнання, приміщень та стін використовується універсальний засіб "Санітаб", що характеризується економічністю та ефективністю застосування.

Концентрація робочого розчину визначається залежно від об'єкту обробки, типу збудника та характеру забруднень. Для стандартної обробки застосовують розчини з концентрацією активного хлору від 0,01 до 0,3%. При боротьбі зі спороутворюючими мікроорганізмами концентрацію підвищують до 0,5-3% за активним хлором.

Приготування робочих розчинів здійснюється шляхом розчинення визначеної кількості таблеток у воді. Для отримання 0,1% концентрації активного хлору необхідно розчинити 7 таблеток у 10 л води, а для 0,3% - 20 таблеток на 10 л. Готовий розчин обов'язково маркується.

Ефективність антимікробної дії підвищується при нагріванні робочих розчинів до 40-45°C. Для очищення внутрішніх поверхонь технологічного обладнання та трубопроводів від осадів застосовують кислотні миючі засоби на основі неорганічних та органічних кислот. Важливо зазначити, що кислотну обробку проводять після попереднього миття обладнання лужними розчинами.

### *ДР 1.3. Підготовка приміщень*

Підготовка виробничих приміщень передбачає виконання комплексу послідовних санітарно-гігієнічних заходів. До них належать вологе прибирання, дезінфекційна обробка поверхонь, а також, за необхідності, їх опромінення ультрафіолетом. Всі процедури здійснюються відповідно до стандартних робочих процедур підприємства, при цьому персонал використовує спеціальний одяг, що відповідає класу чистоти конкретного виробничого приміщення.

Оцінка мікробіологічної чистоти поверхонь у виробничих зонах проводиться згідно з Методичними рекомендаціями, які затверджені наказом Міністерства охорони здоров'я України.

#### *ДР.1.3.1. Генеральне прибирання*

Комплексне прибирання охоплює стандартні щоденні процедури та передбачає виконання розширеного переліку робіт. До додаткових заходів належить очищення стельових поверхонь, санітарна обробка та дезінфекція каналізаційних комунікацій, чищення вентиляційних систем та повітропроводів, догляд за освітлювальними приладами та миття віконних конструкцій ззовні. Невід'ємною частиною процесу є впорядкування вмісту шаф та стелажних конструкцій.

#### *ДР.1.3.2. Щоденне прибирання*

Процедура поточного прибирання здійснюється після завершення кожної робочої зміни. Процес починається з вилучення виробничих відходів за

наявності такої потреби, після чого виконується очищення від механічних забруднень із застосуванням пілососного обладнання.

Наступний етап передбачає вологе прибирання з використанням теплового водного розчину мийного засобу, який застосовується з розрахунку 100-150 мл на квадратний метр площі. Завершальні етапи включають ополіскування поверхонь теплою водою, їх ретельне висушування та проведення дезінфекційної обробки, яка виконується у напрямку від найвіддаленішої від дверей ділянки приміщення.

По завершенні всіх підготовчих процедур складається офіційний протокол, який засвідчується підписами осіб, відповідальних за дотримання санітарно-гігієнічних норм у приміщенні.

#### *ДР.1.4. Підготовка обладнання та комунікацій*

##### *ДР.1.4.1. Огляд, миття та ополіскування апаратів*

Процес очищення обладнання розпочинається з технічного огляду. Спершу необхідно зупинити все обладнання та провести ретельну перевірку його справності. Після підтвердження технічної готовності обладнання, проводиться повне спустошення ферментера.

Для подальшого очищення обладнання застосовується метод циркуляційної СІР-мийки (Clean-in-Place), який є ефективною системою автоматизованого очищення без демонтажу обладнання.

Процес очищення ферментера реалізується шляхом монтажу на його верхню кришку спеціальної кульової головки, оснащеної множинними форсунками. Установка СІР з'єднується з ферментом за допомогою системи трубопроводів.

Приготування миючих розчинів необхідної концентрації здійснюється із застосуванням прецизійних дозуючих насосів. Подальший етап включає подачу цих розчинів під тиском до головки СІР, яка, обертаючись на високих швидкостях, забезпечує ефективне очищення внутрішніх поверхонь ферментера.

Наступною фазою є ретельне ополіскування внутрішнього простору ферментера від залишків миючого розчину з використанням очищеної води або

води для ін'єкцій. Завершення циклу очищення характеризується автоматичним відключенням установки СІР.

Описана методика очищення демонструє не лише високу продуктивність, але й економічну ефективність. Після завершення процесів миття та ополіскування проводиться комплексний технічний огляд, під час якого здійснюється верифікація щільності та цілісності запірної арматури та комунікаційних систем обладнання.

#### *ДР.1.4.2. Перевірка на герметичність*

Процедура перевірки герметичності здійснюється із використанням насиченої пари у поєднанні зі спеціальним пінним миючим засобом. Процес розпочинається з нанесення мийного розчину на всі фланцеві з'єднання обладнання. Після цього ферментер герметично закривається, і протягом 30 хвилин у систему подається насичена водяна пара під надлишковим тиском 0,15-0,2 МПа.

Даний метод діагностики забезпечує оперативне виявлення потенційних пошкоджень системи, оскільки поява бульбашок у будь-якій зоні слугує чітким індикатором порушення герметичності конструкції.

#### *ДР.1.4.3. Стерилізація обладнання та комунікацій*

Стерилізація являє собою багатоетапний процес, під час якого одночасно здійснюється стерилізація як фільтраційних елементів, так і самого ферментера.

Початковий етап передбачає попередній прогрів ферментера шляхом подачі глухої пари в сорочку апарата. Цей підготовчий крок є критично важливим для запобігання можливої деформації конструктивних елементів обладнання.

Після досягнення необхідного температурного режиму починається основна фаза стерилізації, яка здійснюється за допомогою гострої пари. Процес проводиться при температурі 130-135 °С під тиском 0,2 МПа протягом однієї години.

## **ДР 2. Підготовка азоту для культивування**

### *ДР 2.1. Подача газу*

Азот подається через вентель з балону (**Б-23**) до газового фільтра (**ГФ-22**).

### *ДР 2.2. Очищення азоту в індивідуальних фільтрах*

Індивідуальні фільтри (**Ф-25, Ф-27**) встановлюються перед інокуляторами та виробничим ферментером.

## **ДР 3. Підготовка аераційного повітря**

### *ДР 3.1. Забір атмосферного повітря*

Процес забору атмосферного повітря здійснюється за допомогою спеціалізованого повітрозбірника (ПЗ-1), який розташований на висоті від 20 до 30 метрів над рівнем землі.

Після забору повітря транспортується через повітрозабірну шахту під впливом компресорної установки до фільтра попереднього очищення (ФГО-2), де відбувається первинна фільтрація повітряного потоку.

### *ДР 3.2. Очищення від пилу і механічних часток.*

На етапі попереднього очищення повітря відбувається видалення значного обсягу великих пилових частинок, розмір яких становить від 150 до 300 мікрометрів. Для реалізації цього етапу застосовуються спеціалізовані фільтри грубої очистки типу ФЯП (ФГО-2).

Конструкція фільтра складається з рамкового каркасу, виготовленого з оцинкованої сталі. Всередині рамкової конструкції розміщується об'ємний фільтруючий елемент, виготовлений з поліуретанового матеріалу. Технічні характеристики даної фільтраційної системи забезпечують ефективність очищення повітряного потоку на рівні 80 відсотків.

### *ДР 3.3. Стиснення повітря*

Процес компресії повітря реалізується в компресорній установці (К-3), яка забезпечує підвищення тиску до рівня 0,35-0,5 МПа. В процесі стиснення відбувається значне підвищення температури повітряного потоку, яка може досягати позначки 200 градусів Цельсія.

### *ДР 3.4. Охолодження та видалення вологи*

Після стиснення повітря проходить етап охолодження в теплообміннику-охолоджувачі (ТО-4), де його температура знижується до діапазону 25-40 градусів Цельсія. В процесі охолодження стисненого повітря відбувається конденсація значної частини наявної вологи - від 50 до 70 відсотків початкового вмісту. Сконденсована волога ефективно відділяється від повітряного потоку за допомогою спеціальних вологовідділювачів.

#### *ДР 3.5 Нагрівання*

З метою забезпечення стабільної та ефективної роботи головного та індивідуальних фільтраційних елементів, повітряний потік піддається нагріванню в теплообміннику-нагрівачі (ТН-5) до температурного рівня 60 градусів Цельсія.

#### *ДР 3.6. Очищення в головному фільтрі*

Наступна стадія очищення повітря здійснюється в головному фільтрі (Ф-7). В якості головного фільтраційного елемента використовується високоефективний фільтр моделі ФТО-750, який забезпечує ступінь очищення повітряного потоку на рівні 99,92 відсотків.

#### *ДР 3.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі*

На завершальному етапі очищення повітря використовуються індивідуальні фільтри тонкої очистки моделей Ф-25 та Ф-26. Фільтруючий матеріал цих установок підлягає стерилізації паром при температурі 145 градусів Цельсія. В результаті застосування даної багатоступеневої системи фільтрації отримується стерильне аераційне повітря з надзвичайно високим ступенем очищення, що досягає показника 99,9999 відсотків.

### **ДР 4. Приготування титрувальних агентів**

#### *ДР 4.1. Зберігання аміачної води*

$\text{NH}_4\text{OH}$  як титруючий агент не вимагає стерилізації та доступний у готовій до використання формі. Аміачну воду зберігають у герметичному заводському резервуарі на складі (до подальшого використання). При необхідності, аміачну воду переливають в виробничий збірник (З-8), до подальшого регулювання рН.

## ДР 5. Приготування розчину мікроелементів

Розчин мікроелементів готується з розрахунку 1 мл на 1 л поживного середовища, тому розрахуємо необхідний об'єм запасного розчину для кожного етапу культивування (табл. 6.1).

Таблиця 6.1

### Об'єм запасного розчину мікроелементів

Об'єм поживного середовища, л	Об'єм запасного розчину, мл
2,5	500

#### ДР 5.1. Приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів

На технічних вагах проводять зважування компонентів: 1 г MgSO<sub>4</sub> та 1 г MnSO<sub>4</sub>. За допомогою мірного циліндра відміряють 500 мл питної води. Відважені компоненти переносять до колби місткістю 750 мл та ретельно перемішують. Колбу закривають ватно-марлевым корком і здійснюють стерилізацію в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хвилин.

## ДР 6. Приготування та стерилізація поживних середовищ

*ДР 6.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у флаконах*

Розрахунки кількісного складу компонентів для приготування 2500 мл поживного середовища, яке використовується для вирощування посівного матеріалу у флаконі, представлені у таблиці 6.2. Для точного дотримання рецептури необхідно керуватися даними, наведеними у цій таблиці.

Таблиця 6.2

### Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу у флаконі

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 2,5 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Декстроза моногідрат	25	625	А	2
Дріжджовий екстракт	10	62,5		
Пептон	5	2,5		
Вода		2 л		
Р-н мікроелементів		0,5 л		0,5
Разом		2,5		2,5

#### ДР 6.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах проводять зважування компонентів: 625 г декстрази, 62,5 г дріжджового екстракту та 2,5 г пептону. За допомогою мірного циліндра

відміряють 2000 мл очищеної води. Зважені компоненти переносять до скляного бутля місткістю 2500 мл, ретельно перемішують вміст. Бутль закривають стерильним ватно-марлевым корком та проводять стерилізацію в автоклаві при температурі 112°C протягом 30 хвилин.

*ДР 6.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 30 л*

Посівне середовище об'ємом 25,5 л готують з урахуванням подальшого внесення 2,5 л рідкого посівного матеріалу, щоб досягти повного об'єму інокулятора 30 л. Всі необхідні компоненти для приготування поживного середовища та їх кількість мають бути вказані в таблиці 6.3, яка слугує основою для розрахунків пропорцій компонентів.

Для коректного приготування середовища потрібно враховувати:

1. Загальний об'єм середовища - 25,5 л
2. Об'єм посівного матеріалу - 2,5 л
3. Кінцевий об'єм в інокуляторі - 30 л

Однак для надання більш детальної інформації щодо конкретних розрахунків компонентів середовища, потрібні дані з таблиці 6.3, яка має містити точні пропорції складових компонентів.

*Таблиця 6.3.*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 25,5 л поживного середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 25,5 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Декстроза моногідрат	25	637,5	А	15,5
Дріжджовий екстракт	10	255		
Пептон	5	127,5		
Вода		13,95 л		
Конденсат		1,55 л		
MgSO <sub>4</sub>	0,05	1,275	Б	10
MnSO <sub>4</sub>	0,02	0,51		
Вода		9 л		
Конденсат		1		
Разом		25,5		25,5

### *ДР 6.2.1. Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних вагах здійснюють відважування наступних компонентів: 637 г декстрази, 255 г дріжджового екстракту та 127 г пептону. Відважені компоненти переносять до реактора-змішувача РЗ-10, який має робочий об'єм 20 л. За допомогою лічильника до реактора додають 14 л питної води та вмикають перемішувальний пристрій.

Стерилізацію приготованої композиції проводять безпосередньо у збірнику при наступних параметрах: тиск 0,15 МПа, температура 112°C, тривалість 30 хвилин. Після завершення процесу стерилізації проводять обов'язковий мікробіологічний контроль якості середовища. Транспортування стерильної композиції здійснюють за допомогою відцентрового насоса НВ-12.

### *ДР 6.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 1,3 г  $MgSO_4$ , 0,5 г  $MnSO_4$ . Наважки поміщають в збірник - змішувач об'ємом 10 л (стерилізація композиції буде відбуватись безпосередньо в інокуляторі ІН- 24), та за допомогою лічильника додають 9 л питної води та включають перемішувальний пристрій. Композицію солей відцентровим насосом подають до інокулятора, та стерилізують шляхом подачі пари при  $t = 131\text{ }^{\circ}C$  (40 хв).

### *ДР 6.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 300 л*

Для ферментера об'ємом 300 л готують 247 л поживного середовища з урахуванням внесення 25,5 л рідкого посівного матеріалу. Склад компонентів для приготування середовища вказано в таблиці 6.4.

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 247 л поживного середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 247 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Декстроза моногідрат	25	6175	А	150
Дріжджовий екстракт	10	2470		
Пептон	5	1235		
Вода		135 л		
Конденсат		15 л		
MgSO <sub>4</sub>	0,05	13,35	Б	97
MnSO <sub>4</sub>	0,02	4,94		
Вода		87,3 л		
Конденсат		9,7 л		
Разом		247		

*ДР 6.3.1. Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних вагах здійснюють відважування компонентів: 6175 г декстрази, 2470 г дріжджового екстракту та 1235 г пептону. Відважені компоненти переносять до реактора-змішувача РЗ-16 об'ємом 200 л. За допомогою лічильника додають 135 л питної води та вмикають перемішувальний пристрій.

Стерилізацію композиції проводять безпосередньо у збірнику при тиску 0,15 МПа, температурі 112°C протягом 30 хвилин. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль. Транспортування стерильної композиції забезпечується відцентровим насосом НВ-21.

*ДР 6.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 13 г MgSO<sub>4</sub>, 5 г MnSO<sub>4</sub>. Наважки поміщають в збірник - змішувач об'ємом 150 л (стерилізація композиції буде відбуватись безпосередньо у ферментері ФР- 26), та за допомогою лічильника додають 87 л питної води та включають перемішувальний пристрій. Композицію солей насосом відцентровим подають до ферментера, та стерилізують шляхом подачі пари при  $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$  (40 хв).

## **ДР 7. Підготовка посівного матеріалу**

### *ТП 7.1. Підтримання колекційної культури*

*Bifidobacterium bifidum* зберігається при +4°C (в холодильнику) на напіврідкому МРС-агарі з 0,5% глюкози та крейдою. Один раз в 1-3 місяці потрібно робити пересів. Усі роботи з *Bifidobacterium bifidum* виконуються в абсолютно стерильних умовах. Висівом бактерій на чашки Петрі і подальшим його мікроскопіюванням здійснюють контроль чистоти і активності культури.

### *ТП 7.2. Одержання робочої культури*

До ізольованих колоній на чашки Петрі із МРС середовищем, розсіюють культуру *Bifidobacterium bifidum* за допомогою петлі, потім при температурі +37°C протягом 48 год відбувається культивування в анаеростаті.

### *ТП 7.3. Вирощування культури на агаризованому середовищі*

Ізольована колонія, яку в асептичних умовах петлею пересіяли у пробірки з МРС середовищем, засівається кожна в одну окрему пробірку. Після цього проводиться інкубація тривалістю 48 год за температури +37°C. Висівом бактерій на чашки Петрі і подальшим його мікроскопіюванням здійснюють контроль чистоти і активності культури.

### *ТП 7.4. Вирощування посівного матеріалу у флаконах*

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у бутлі об'ємом 2500 мл, вносять 2000 мл розчину композиції А (від ДР 6.1.1), 500 мл запасного розчину мікроелементів (від ДР 5.1). Готове поживне середовище розливають у колби та посівний матеріал (від ТП 7.3), перемішують. Закривають гумовою пробкою, щоб забезпечити анаеробні умови, і поміщають у термостат. Тривалість вирощування – 24 год, температура 37 °С. Проводять мікроскопічний та мікробіологічний контроль.

### *ТП 7.5. Вирощування в інокуляторі 30 л*

Процес культивування проводять в інокуляторі ІН-24 робочим об'ємом 30 л. Спочатку в простерилізований інокулятор, що містить 10 л композиції Б (ДР 6.2.2), за допомогою насоса вносять 15,5 л композиції А (від ДР 6.2.1).

За допомогою автоматизованої системи подачі титранта проводять коригування рН середовища до значень 6,8-7,0, використовуючи розчин NH<sub>4</sub>OH (від ДР 4.1). Після цього через трубу перетискування вносять посівний матеріал (від ТП 7.4).

Для забезпечення анаеробних умов культивування через барботер подають газоподібний азот, який витісняє повітря з системи. Після герметизації інокулятора розпочинають процес культивування при температурі 37°C тривалістю 24 години.

По завершенню процесу відбирають зразки культуральної рідини для проведення мікробіологічного та мікроскопічного контролю.

## **ТП 8. Біосинтез**

### *ТП 8.1. Виробниче культивування*

У ферментер (**ФР-26**) з простерилізованою композицією Б об'ємом 97л (від ДР 6.3.2) насосом подають 150 л композиції А (від ДР 6.3.1), охолодженої після стерилізації, до 45 °С.

Холодну воду і насичену пару подають в сорочку ферментера, потім значення температури поживного середовища підтримується на рівні 37°C. Після оптимізації температури і рН розчином NH<sub>4</sub>OH (від ДР 4.1), у ферментер через трубу перетискування перекачують посівний матеріал з минулої стадії підготовки інокуляту (від ТП 7.5).

Тривалість культивування - 24 год. Через кожні 4 години з культуральної рідини відбирається зразок та виконується мікробіологічний контроль. Під час культивування відбувається автоматичний контроль значення рН автоматичною подачею аміачної води (від ДР 4.1).

Процес культивування *Bifidobacterium bifidum* 1 ведеться до досягнення  $2,5 \times 10^9$  КУО/мл. Готову культуральну рідину за допомогою насосу (**Н-28**) подають далі на етап відділення біомаси від культуральної рідини.

## РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

### *7.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища, чистоти посівного матеріалу та чистоти культуральної рідини*

#### **Мікробіологічний контроль**

*Мікробіологічний контроль чистоти посівного матеріалу та культуральної рідини*

Мікробіологічний контроль проводиться двома методами. Перший метод передбачає розсів досліджуваного матеріалу на чашки Петрі з агаризованими поживними середовищами. Другий метод - експрес-контроль шляхом прямого мікроскопіювання зразків, що дозволяє швидко оцінити мікробіологічну чистоту культури [32].

Перед проведенням мікроскопіювання необхідно зафарбувати *Bifidobacterium bifidum* 1 за Грамом.

#### **Фарбування за Грамом**

Підготовка зразка для фарбування Досліджуваний матеріал рівномірно розподіляють тонким шаром на поверхні попередньо знежиреного предметного скла. Отриманий мазок залишають висихати на повітрі, після чого проводять його фіксацію.

#### **Процедура фарбування за методом Грама**

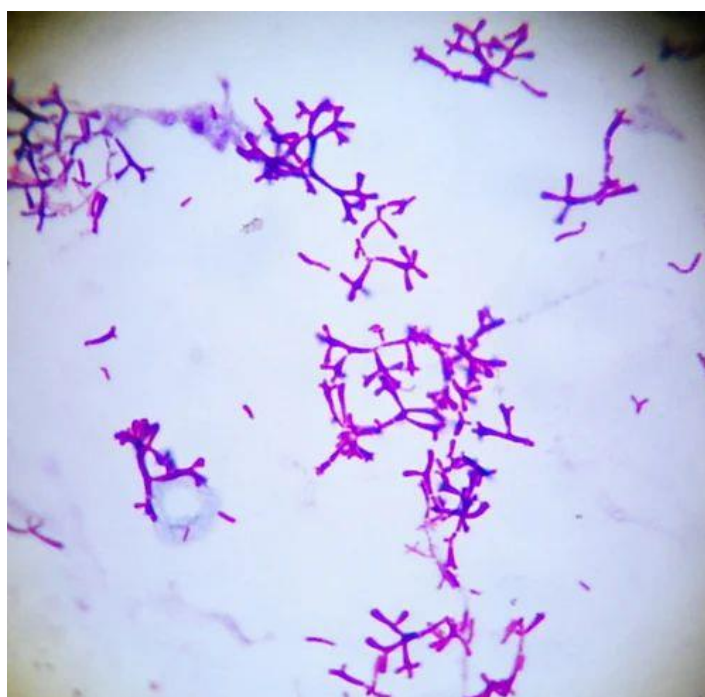
1. Готують мазок досліджуваної бактеріальної культури на предметному склі.
2. Здійснюють висушування на повітрі та фіксацію у полум'ї спиртівки.
3. Наносять достатню кількість розчину карболового генціанвіолету на фіксований мазок, витримують 1-2 хвилини.
4. Зливають барвник та, не промиваючи водою, обробляють мазок розчином Люголя до почорніння протягом 1-2 хвилин.

					НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ющенко Н.О.			РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Старовойтова С.О.					50	81
Реценз.						Кафедра БТМ 50		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

5. Видаляють розчин Люголя та обробляють препарат 96° етанолом протягом 0,5-1 хвилини (точне дотримання часу критично важливе). Обробку можна проводити двома способами: зануренням у ємність зі спиртом або нанесенням спирту безпосередньо на мазок.
6. Промивають препарат водою та забарвлюють водним розчином фуксину протягом 1-2 хвилин.
7. Видаляють барвник, промивають препарат водою та висушують фільтрувальним папером.
8. Проводять мікроскопію препарату з використанням імерсійної системи.

В результаті фарбування грампозитивні бактерії набувають синьо-фіолетового забарвлення, тоді як грамнегативні забарвлюються у червоний або рожевий колір фуксину.

Під час мікроскопіювання ми, повинні побачити синьо-фіолетове забарвлення клітин, тому що *Bifidobacterium bifidum* 1 Гр+ [33].



**Рис. 7.1.** *Bifidobacterium bifidum* 1: вигляд під мікроскопом

Мікроскопіювання штаму *Bifidobacterium bifidum* 1, проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою, для отримання об'ємного зображення досліджуваного м/о.

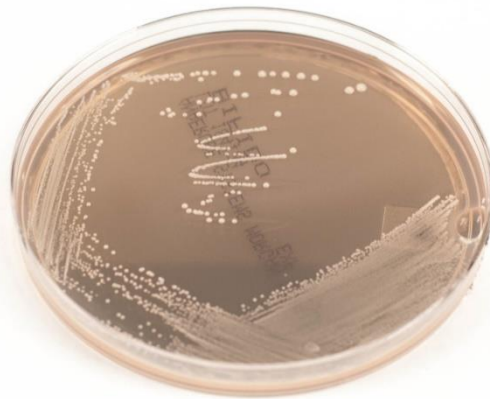
### **Методика приготування препарату для мікроскопії**

На ретельно знежирене предметне скло в асептичних умовах наносять невелику краплю культуральної рідини, використовуючи стерильну бактеріологічну петлю. За допомогою цієї ж петлі краплю рівномірно розподіляють по поверхні скла, формуючи мазок діаметром приблизно 1 см.

Підготовлений мазок залишають висихати при кімнатній температурі до повного випаровування вологи, уникаючи додаткового нагрівання. Після повного висихання на препарат наносять 1-2 краплі імерсійного масла, використовуючи скляну паличку. Після завершення мікроскопії залишки імерсійного масла з об'єктива видаляють ватним тампоном, змоченим етиловим спиртом.

При мікроскопічному дослідженні зразка, не контамінованого сторонньою мікрофлорою, можна спостерігати характерні клітини *Bifidobacterium bifidum* 1, які відрізняються вираженою розгалуженістю та подвоєними кінцями, що відображено на рисунку 5.1.

Ці бактерії мають розмір, який приблизно становить  $0,45 \times 8$  мкм. Колонії на щільному модифікованому середовищі МРС світлі та невеликі (рис. 5.2).



**Рис. 7.2.** Колонії штаму *Bifidobacterium bifidum* 1 на агаризованому середовищі МРС

#### *Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища*

Для виявлення бактеріального забруднення проводять висів культуральної рідини на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА). Посів здійснюють бактеріологічною петлею методом розсіву до отримання ізольованих колоній.

При проведенні мікробіологічного контролю стерильності поживних середовищ аналогічним чином здійснюють висів проби простерилізованого поживного середовища на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення можливої бактеріальної контамінації [9].

### **7.2. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю**

Амінний азот можна визначити у пептоні, який є джерелом азоту та містить амінокислоти і пептиди. Для встановлення концентрації використовується метод формольного титрування за Серенсенем (алкаліметричний метод). Принцип методу базується на тому, що при рН 7,0 формальдегід блокує вільні аміногрупи, після чого проводиться титрування карбоксильних груп лугом у кількості, що відповідає еквіваленту.

У мірний стакан об'ємом 50 мл додають 17 мл дистильованої води та 3 мл досліджуваного зразка, попередньо відібраної проби. У суміш занурюють електроди рН-метра і, при постійному перемішуванні, титрують розчином 0,1 М гідроксиду натрію до досягнення рН 7,0. Потім у розчин додають 2 мл 35%-го формальдегіду, продовжують перемішування і титрують тим самим розчином гідроксиду натрію до досягнення рН 9,2 або стабільного значення, що не змінюється протягом 2 хвилин. Як альтернативу можна використовувати фенолфталеїн (1%-й розчин) як індикатор, за забарвленням якого визначають завершення реакції (поява слабкого рожевого відтінку). Фіксують об'єм гідроксиду натрію, витрачений на титрування, і повторюють процедуру для перевірки результатів. Одночасно проводять контрольний експеримент, у якому замість 3 мл зразка додають 3 мл дистильованої води, щоб перевірити реактиви. Об'єм гідроксиду натрію, витрачений у контрольному аналізі, також фіксується.

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

$$X = V \cdot K \cdot 1.4 \cdot 100 / 2$$

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

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

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

2 – об'єм зразка, мл [22].

Джерелом вуглецю в середовищі для культивування *Bifidobacterium bifidum* 1 є глюкоза.

Флуориметричний метод визначення концентрації глюкози в культуральній рідині заснований на використанні флуоресцентних реагентів, які реагують з глюкозою і утворюють флуоресцентний комплекс. Інтенсивність флуоресценції цього комплексу прямо пропорційна концентрації глюкози в зразку.

Глюкоза в культуральній рідині реагує з флуоресцентним реагентом, утворюючи комплекс, який при збудженні світлом певної довжини хвилі випромінює світло іншої довжини хвилі (флуоресценція). Інтенсивність цього випромінювання вимірюється за допомогою флуориметра, і на основі калібрувальної кривої визначається концентрація глюкози.

#### Матеріали та реагенти:

1. Зразок культуральної рідини, що містить глюкозу.
2. Флуоресцентний реагент, що специфічно реагує з глюкозою (наприклад, о-толуїдин, антрон або інші специфічні реагенти).
3. Буферний розчин, необхідний для підтримання оптимального рН реакції.
4. Стандартні розчини глюкози з відомими концентраціями для побудови калібрувальної кривої.
5. Флуориметр, пристрій для вимірювання інтенсивності флуоресценції.

Для приготування флуоресцентного реагенту необхідну кількість реагенту розчиняють у буферному розчині, який підходить для реакції з глюкозою. Далі відбирають кілька проб із культуральної рідини для аналізу та готують стандартні розчини глюкози різної концентрації для побудови калібрувальної кривої. До кожного зразка та стандарту додають флуоресцентний реагент у відповідній пропорції, після чого суміші інкубують при визначеній температурі, щоб забезпечити повну реакцію. Після інкубації зразки та стандарти поміщають у флуориметр, де їх збуджують світлом певної довжини хвилі. Потім вимірюють інтенсивність флуоресценції, яка випромінюється при цій довжині хвилі.

Отримані значення інтенсивності флуоресценції для стандартних розчинів наносять на графік, що дозволяє побудувати калібрувальну криву. На основі цієї кривої визначають концентрацію глюкози в зразках культуральної рідини, порівнюючи виміряну інтенсивність флуоресценції з калібрувальною кривою [35].

### ***7.3. Визначення концентрації біомаси***

Біомасу кількісно визначали шляхом вимірювання оптичної щільності, виміряної при 620 нм за допомогою спектрофотометра. Спектрофотометрична абсорбція корелювала з концентрацією біомаси за допомогою стандартної кривої, побудованої на основі відповідного штаму. Зразки для вимірювання оптичної щільності розбавляли, щоб переконатися, що виміряні значення були між 0-2 і 0-8. Потім розраховували OD<sub>620</sub> кожного зразка як добуток виміряного значення та кратного розведення [34].

### ***7.4. Визначення кількості життєздатних клітин***

Визначення кількості життєздатних біфідобактерій є критичним параметром контролю якості. Процес оцінки проводиться шляхом паралельного тестування досліджуваного зразка та робочого стандартного зразка Біфідумбактерину для забезпечення достовірності результатів. Це порівняльне дослідження дозволяє встановити відповідність препарату встановленим нормам та стандартам якості щодо вмісту живих біфідобактерій.

Кількість життєздатних клітин визначали за допомогою методу Коха.

Для підрахунку колонієутворюючих одиниць (КУО) в культуральному середовищі спочатку готують серійні розбавлення зразка, щоб зменшити концентрацію мікроорганізмів до рівня, придатного для підрахунку. Після приготування розбавлень, певну кількість зразка з кожного розбавлення наносять на поверхню агаризованого середовища МРС у чашках Петрі. Зразки інкубують при відповідній температурі до появи видимих колоній, зазвичай протягом 24–48 годин.

Після інкубації рахують кількість колоній на кожній пластинці. Для підрахунку КУО вибирають ті пластинки, на яких кількість колоній знаходиться

в межах 30–300, що вважається оптимальним діапазоном для точного підрахунку. Кількість колоній на пластинці множать на відповідний коефіцієнт розведення, щоб отримати КУО на мілілітр або грам вихідного зразка [9].

### 7.5. Карта постадійного контролю

#### Карта постадійного контролю

Таблиця 7.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Кх 1.2.1 Підготовка мийних засобів («Біонол» та каустична сода)	Концентрація розчинів	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 2 %
Кх 1.2.3 Приготування дезінфікуючих засобів для обладнання	Концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 0,3 %
Км 1.3.1 Генеральне прибирання	Підлога, стіни, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду КУО < 800/см
Км 1.3.2 Щоденне прибирання	Підлога, стіни, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду КУО < 300/см
Кт 1.4.2 Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність	$\tau = 30$ хв
Кт 1.4.5 Стерилізація обладнання та комунікацій	Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	t = 130-135°C $\tau = 1$ год
Кт 3.2 Очищення від пилу і механічних часточок	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80 %, тиск згідно паспорту

Кт 3.3 Стиснення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$P=0,35-0,5$ МПа $t=200$ °С
Кт 3.4 Охолодження та видалення вологи	Охолоджене повітря	Термометр технічний	Під час проведення операції	$t = 25-40$ °С $W=50-70$ °
Кт 3.5 Нагрівання	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t = 60$ °С
Кт 3.6 Очищення в головному фільтрі	Очищене повітря	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на тиждень	$E = 99,92$ %
Кт 3.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на місяць	$E = 99,9999$ %
Кх 4.1 Зберігання аміачної води	Перевірка концентрації	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	$C = 25$ %
Кт, Км 5.1 Приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів	Температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131$ °С $\tau = 40$ хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 6.1.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112$ °С $\tau = 30$ хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 6.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112$ °С $\tau = 30$ хв Відсутність мікробіоти

Кт 3.3 Стиснення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$P=0,35-0,5$ МПа $t=200$ °С
Кт 3.4 Охолодження та видалення вологи	Охоложене повітря	Термометр технічний	Під час проведення операції	$t = 25-40$ °С $W=50-70$ °
Кт 3.5 Нагрівання	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t = 60$ °С
Кт 3.6 Очищення в головному фільтрі	Очищене повітря	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на тиждень	$E = 99,92$ %
Кт 3.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на місяць	$E = 99,9999$ %
Кх 4.1 Зберігання аміачної води	Перевірка концентрації	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	$C = 25$ %
Кт, Км 5.1 Приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів	Температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131$ °С $\tau = 40$ хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 6.1.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112$ °С $\tau = 30$ хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 6.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112$ °С $\tau = 30$ хв Відсутність мікробіоти

Кт, Км 6.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C τ = 60 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 6.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 6.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C τ = 60 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.1 Підтримання колекційної культури	Температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час збереження, мікробіологічний контроль після збереження	t = 4 °C відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 7.2 Одержання робочої культури	Тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 37°C, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 7.3 Вирощування культури на агаризованому середовищі	Тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 37°C, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км 7.4 Вирощування посівного матеріалу у флаконах	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безпосередньо під час виробничого процесу.	t = 37°C, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 7.5 Вирощування в інокуляторі 30л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.	t = 37°C, τ = 24 год, рН=6, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 8.1 Виробниче культивування	Культуральна рідина, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу. Відбір проб культуральної рідини – кожні 4 год.	t = 37 °C, τ = 24 год, рН=6, конц. кл.= 2,5×10 <sup>9</sup> КУО/мл, відсутність сторонньої мікробіоти.

## РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

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

При аналізі технологічної схеми виробництва біомаси *Bifidobacterium bifidum* були виявлені наступні місця утворення відходів:

*Таблиця 8.1*

Місця емісії, об'єми та шкідливість відходів, що утворюються на  
проектованому виробництві

Тип відходів	Назва відходів	Речовини, що входять до складу відходів	Стадія виробництва	Приблизна кількість відходів за 1 цикл виробництва	Клас небезпеки
Газоподібні	Відпрацьоване повітря з інокулятора	CO <sub>2</sub> , клітини біфідобактерій, водяна пара	ТП 7.5 Вирощування в інокуляторі	17,3 м <sup>3</sup>	IV
	Відпрацьоване повітря з ферментера	CO <sub>2</sub> , клітини біфідобактерій, водяна пара	ТП 8.1 Виробниче культивування	163,6 м <sup>3</sup>	IV
Рідкі	Відпрацьований розчин миючих засобів	"Біонол", каустична сода (2%)	ДР 1.4.1 Миття обладнання	150 л	III
	Відпрацьований дезрозчин	"Санітаб" (0,3%)	ДР 1.2.3 Дезінфекція обладнання	100 л	IV
	Конденсат	Водяна пара	ДР 1.4.3 Стерилізація обладнання	25 л	IV
	Промивні води	Залишки поживного середовища	ДР 6 Приготування поживних середовищ	200 л	IV

<b>НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ</b>				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Юценко Н.О.		
Перевір.		Старовойтова С.О.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ				
		Літ.	Арк.	Акрівшів
			61	81
Кафедра БТМ 61				

Тверді	Використана тара від реактивів	Поліетилен, поліпропілен	ДР 1.2 Підготовка розчинів	5 кг	IV
	Фільтрувальні матеріали	Фільтрувальний папір, механічні домішки	ДР 3.2, ДР 3.6 Очистка повітря	2 кг	IV
	Пакувальні матеріали	Картон, папір	Допоміжні роботи	10 кг	IV

Основними джерелами утворення відходів є:

Газоподібні відходи:

- На стадії ТП 7.5 (вирощування в інокуляторі об'ємом 30 л) утворюється близько 17,3 м<sup>3</sup> відпрацьованого повітря за цикл культивування. Повітря містить CO<sub>2</sub>, який утворюється в процесі метаболізму біфідобактерій, водяну пару та аерозоль клітин продуцента.
- При виробничому культивуванні (ТП 8.1) у ферментері об'ємом 300 л утворюється значно більша кількість відпрацьованого повітря - 163,6 м<sup>3</sup> за цикл. Склад аналогічний, але концентрація клітин вища через більшу біомасу.

Рідкі відходи:

1. Миючі розчини:

- Відпрацьований 2% розчин "Біонолу" та каустичної соди (150 л/цикл) утворюється на стадії ДР 1.4.1 при СІР-мийці обладнання.
- Ці розчини містять поверхнево-активні речовини та лужні компоненти, тому відносяться до III класу небезпеки і потребують нейтралізації перед скиданням.

2. Дезінфікуючі розчини:

- На стадії ДР 1.2.3 утворюється близько 100 л відпрацьованого 0,3% розчину "Санітабу".
- Містить активний хлор, тому потребує спеціальної утилізації для запобігання негативного впливу на довкілля.

3. Технологічні води:

- Конденсат після стерилізації обладнання (ДР 1.4.3) - близько 25 л/цикл.

- Промивні води після приготування поживних середовищ (ДР 6) - до 200 л/цикл, містять залишки компонентів середовища.
- Ці води відносяться до IV класу небезпеки і можуть бути направлені на локальні очисні споруди.

Тверді відходи:

1. Пакувальні матеріали:

- Тара з-під реактивів (поліетилен, поліпропілен) - близько 5 кг/цикл.
- Картонні коробки, папір - до 10 кг/цикл.
- Підлягають сортуванню та переробці згідно принципів циркулярної економіки.

2. Відпрацьовані фільтрувальні матеріали:

- Утворюються на стадіях очистки повітря (ДР 3.2, ДР 3.6).
- Містять механічні домішки та мікроорганізми.
- Потребують дезінфекції перед утилізацією.

Для мінімізації впливу на довкілля необхідно впровадити наступні заходи:

1. Встановити вискоелективні фільтри для очистки відпрацьованого повітря від аерозолу мікроорганізмів перед викидом в атмосферу.
2. Організувати систему роздільного збору відходів за категоріями:
  - Біологічні відходи
  - Хімічні відходи
  - Пакувальні матеріали
  - Фільтрувальні матеріали
3. Впровадити локальні очисні споруди для попередньої очистки стічних вод, що включають:
  - Механічну очистку
  - Нейтралізацію
  - Біологічну очистку
4. Розробити стандартні операційні процедури поводження з відходами згідно вимог належної виробничої практики (GMP) та екологічного законодавства [23, 24].

5. Вести облік утворення відходів та контролювати їх передачу спеціалізованим підприємствам для утилізації [25].

Запропоновані заходи дозволять мінімізувати негативний вплив виробництва на довкілля та забезпечити виконання вимог природоохоронного законодавства України. Згідно з Постановою КМУ №1279 від 05.12.2023, для мінімізації впливу на довкілля необхідно впровадити систему управління відходами, що включає їх облік, належне зберігання та утилізацію [23].

Для подальшого вдосконалення системи управління відходами доцільно впроваджувати біотехнологічні методи їх переробки [26, 27], що дозволить замкнути цикл використання ресурсів та знизити навантаження на навколишнє середовище.

Відповідно до сучасних тенденцій розвитку біотехнології [28, 29], особливу увагу слід приділити розробці безвідходних технологій та використанню екологічно безпечних матеріалів у виробництві.

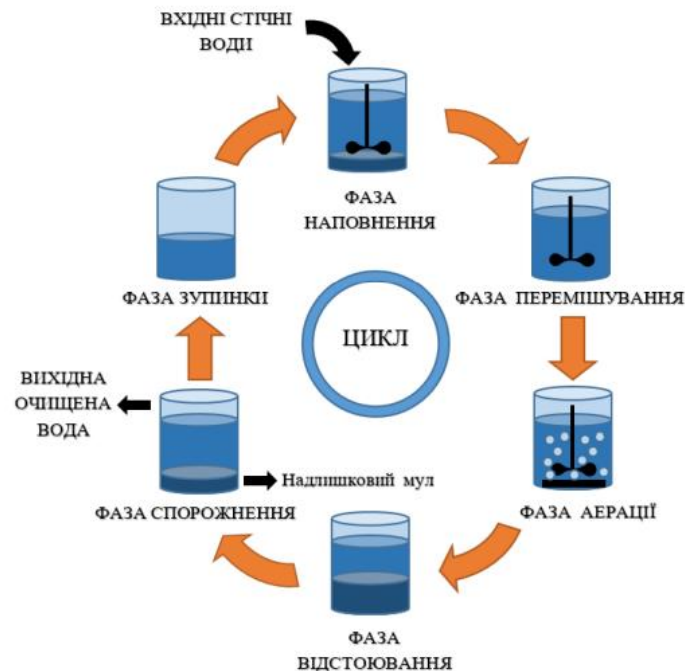
Всі виявлені відходи відносяться до III-IV класів небезпеки, що свідчить про відносно низьку екологічну небезпеку виробництва. Проте необхідно забезпечити їх належну утилізацію згідно з чинним законодавством України у сфері поводження з відходами.

#### **Система знешкодження та утилізації рідких відходів**

На основі проведеного аналізу відходів виробництва біомаси *Bifidobacterium bifidum* та враховуючи специфіку утворених стічних вод, що містять залишки поживних середовищ, миючих та дезінфікуючих засобів, пропонується наступна система очистки:

1. Попередня механічна очистка:
  - Встановлення решіток для видалення крупних механічних домішок
  - Пісковловлювачі для видалення дрібних механічних частинок
  - Первинні відстійники для осадження завислих речовин
2. Фізико-хімічна очистка:
  - Нейтралізація лужних стоків від миття обладнання
  - Коагуляція та флокуляція для видалення колоїдних частинок

- Флотація для видалення поверхнево-активних речовин
3. Біологічна очистка в SBR-реакторі: Для глибокого очищення стічних вод пропонується встановити SBR-реактор об'ємом 50 м<sup>3</sup>, що забезпечить обробку добового об'єму стоків (близько 475 л/добу) з урахуванням коефіцієнту нерівномірності.



*Рис.8.2 Принцип роботи SBR-реактора*

Принцип роботи SBR-реактора включає наступні фази:

1. Наповнення (2-3 години):
  - Подача стічних вод
  - Перемішування для рівномірного розподілу забруднень
2. Аерація (10-12 годин):
  - Насичення киснем для активізації аеробних процесів
  - Біодеградація органічних забруднень
  - Підтримка концентрації розчиненого кисню 2-4 мг/л
3. Відстоювання (2 години):
  - Осадження активного мулу
  - Формування зони освітленої води
4. Декантація (1-2 години):
  - Відведення очищеної води

- Видалення надлишкового мулу
5. Пауза/стабілізація (1-2 години):
- Підготовка до нового циклу
  - Аерація залишкового активного мулу
- Параметри роботи SBR-реактора:
- Температура процесу: 20-25°C
  - рН середовища: 6,5-8,5
  - Концентрація активного мулу: 2-4 г/л
  - Навантаження на активний мул: 0,15-0,2 кг БСК/кг активного мулу на добу
- Ефективність очистки:
- За БСК - 95-98%
  - За ХСК - 90-95%
  - За завислими речовинами - 95-97%
  - За загальним азотом - 75-80%

Переваги запропонованої системи:

1. Компактність обладнання
2. Висока ефективність очистки
3. Гнучкість управління процесом
4. Низькі експлуатаційні витрати
5. Можливість автоматизації

Очищені стічні води будуть відповідати нормативам для скиду в міську каналізаційну мережу згідно з "Правилами приймання стічних вод підприємств у комунальні та відомчі системи каналізації населених пунктів України".

Здійснювати контроль якості очистки за наступними показниками: рН, БСК<sub>5</sub>, ХСК, завислі речовини, загальний азот, загальний фосфор.

#### **Система знешкодження та утилізації твердих відходів**

Аналіз твердих відходів виробництва біомаси *Bifidobacterium bifidum* показав необхідність впровадження комплексної системи їх утилізації з урахуванням специфіки кожного виду відходів.

## **1. Відходи пакувальних матеріалів**

*Система сортування:*

- Поліетиленові відходи (PE) - тара з-під миючих засобів
- Поліпропіленові відходи (PP) - контейнери від компонентів поживного середовища
- Картон та папір - коробки, документація
- Скло - лабораторний посуд

*Етапи обробки:*

1. Первинне сортування на місці утворення
2. Збір у спеціально маркованих контейнерах
3. Очистка від залишків вмісту
4. Пресування для зменшення об'єму
5. Тимчасове зберігання у спеціально відведеному приміщенні
6. Передача на переробку ліцензованим підприємствам

## **2. Відпрацьовані фільтрувальні матеріали**

*Етапи обробки:*

1. Збір у герметичні контейнери
2. Стерилізація в автоклаві (121°C, 45 хв)
3. Зневоднення
4. Пакування у спеціальні мішки
5. Передача на утилізацію спеціалізованим підприємствам

## **3. Відпрацьована біомаса**

*Етапи знешкодження:*

1. Збір у спеціальні контейнери
2. Термічна інактивація (90°C, 60 хв)
3. Хімічна стерилізація (0,5% розчин хлораміну)
4. Зневоднення на фільтр-пресі
5. Компостування з додаванням деструкторів
6. Використання як біодобрива

**Організація системи управління відходами:**

1. Встановлення спеціальних контейнерів для роздільного збору:

- Жовтий - для пластику (PE)
- Синій - для пластику (PP)
- Зелений - для скла
- Коричневий - для паперу/картону
- Червоний - для біологічних відходів

2. Обладнання майданчика тимчасового зберігання:

- Навіс для захисту від опадів
- Тверде покриття
- Система пожежної безпеки
- Вентиляція
- Обмежений доступ

3. Впровадження документообігу:

- Журнал обліку відходів
- Паспорти відходів
- Договори на утилізацію
- Акти передачі на переробку

4. Навчання персоналу:

- Правила сортування
- Техніка безпеки
- Дії при надзвичайних ситуаціях
- Ведення документації

Впровадження даної системи дозволить:

- Зменшити об'єм відходів, що направляються на полігони
- Забезпечити екологічно безпечну утилізацію
- Отримати економічний ефект від продажу вторсировини
- Відповідати вимогам природоохоронного законодавства

Всі операції з відходами будуть проводитися згідно з вимогами "Порядку розроблення, погодження та затвердження місцевих планів управління відходами" (Постанова КМУ №947 від 05.09.2023).

## Система знешкодження та утилізації газоповітряних відходів

На підставі проведеного аналізу газоповітряних викидів виробництва біомаси *Bifidobacterium bifidum*, які утворюються в процесі культивування (загальний об'єм близько 181 м<sup>3</sup> за цикл), пропонується двоступенева система очистки [26].

Перший ступінь очистки реалізується в абсорбційній установці. Відпрацьоване повітря з інокулятора та ферментера за допомогою циркуляційного насоса подається в трисекційний абсорбер, де відбувається уловлювання аерозолі біфідобактерій та дезінфекція. В якості абсорбенту використовується 0,5% розчин перекису водню, що забезпечує ефективну інактивацію мікроорганізмів [27].

Конструкція абсорбера включає три послідовні насадкові секції, заповнені кільцями Рашига. Це забезпечує розвинену поверхню контакту між газовою та рідкою фазами і, відповідно, високу ефективність очистки. Відпрацьований абсорбент періодично оновлюється та направляється на знешкодження разом з рідкими відходами [30].

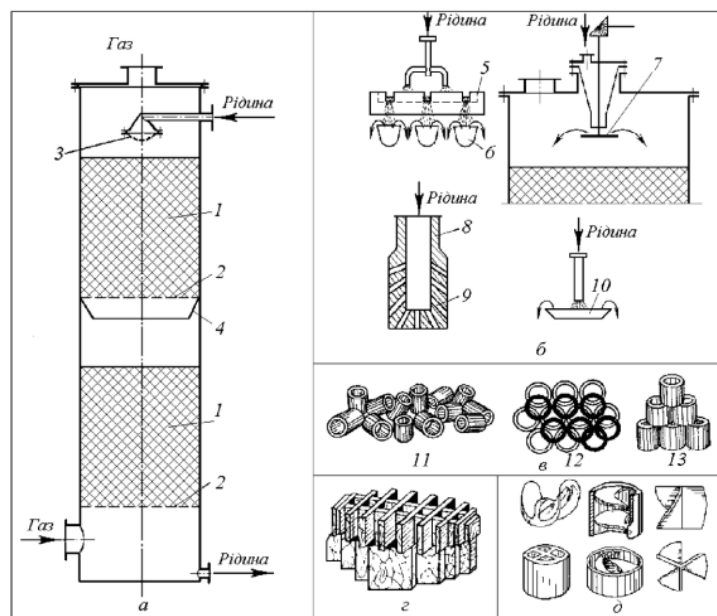


Рис. 8.2.3 Насадний абсорбер: а - схема абсорбера; б - типи розподільних пристроїв; в - кільцева насадка (кільця Рашига), г - хордова насадка, д - фасонна насадка: 1 - шар насадки; 2 - решітка; 3 - розподільний пристрій; 4 - напрямний конус; 5 - центральний жолоб; 6 - розподільні жолоби; 7 - обертовий диск; 8 -

розподільна склянка; 9 - канали; 10 - тарілка; 11 - кільцева насадка, покладена насипом; 12,13 - кільцева насадка, покладена правильними рядами

Для досягнення повної стерильності повітря після абсорбера встановлюється камера УФ-опромінення - другий ступінь очистки. Використовуються УФ-лампи з довжиною хвилі 254 нм, що забезпечує максимальний бактерицидний ефект. Час експозиції розраховується таким чином, щоб досягти повної інактивації залишкової мікрофлори [28].

Ефективність запропонованої системи очистки:

- Уловлювання аерозолю - 99,9%
- Інактивація мікроорганізмів - 99,99%
- Видалення запахів - 95%

Очищене повітря за своїми показниками відповідає нормативам викидів забруднюючих речовин в атмосферне повітря від стаціонарних джерел [31].

Система оснащена контрольно-вимірювальними приладами для моніторингу:

- Витрати повітря
- Концентрації перекису водню
- Ефективності роботи УФ-ламп
- Температури
- Вологості

Запропонована система газоочистки відповідає сучасним тенденціям розвитку екологічних біотехнологій [29] та забезпечує високий рівень захисту атмосферного повітря від забруднення.

Для підвищення енергоефективності процесу можливе впровадження системи рекуперації тепла з очищеного повітря [25], що дозволить знизити енергоспоживання виробництва в цілому.

### **Заходи щодо зменшення об'ємів відходів**

На основі проведеного аналізу утворення відходів при виробництві біомаси *Bifidobacterium bifidum* розроблено комплексну програму щодо зменшення їх

об'ємів. Основною метою є мінімізація впливу виробництва на довкілля та оптимізація використання ресурсів.

Всі запропоновані заходи можна розділити на кілька основних напрямків, що дозволять досягти максимального екологічного та економічного ефекту.

Таблиця 9.2

### Заходи щодо зменшення об'ємів відходів виробництва

Тип відходів	Запропоновані заходи	Очікуваний ефект	Економічний ефект
Рідкі відходи	-Впровадження оборотного водопостачання- Повторне використання конденсату  - Автоматизація СІР-мийки- Використання концентрованих миючих засобів	Зменшення водоспоживання на 45%  Скорочення об'єму стоків на 40%	Економія 150-200 тис. грн/рік
Газоповітряні викиди	- Оптимізація режимів аерації  -Встановлення рекуператорів тепла  -Модернізація фільтрів-Контроль герметичності	Зниження викидів на 25%  Зменшення енерговитрат на 20%	Економія 80-100 тис. грн/рік
Тверді відходи	- Використання багатооборотної тари  - Роздільний збір відходів  - Закупівля реагентів у великій тарі  -Переробка пакувальних матеріалів	Зменшення об'єму на 35%  Збільшення частки переробки до 80%	Додатковий дохід 50-70 тис. грн/рік

Для досягнення максимальної ефективності впровадження даних заходів необхідно забезпечити:

- Постійний моніторинг утворення відходів
- Навчання персоналу
- Регулярний аудит ефективності заходів
- Своєчасне оновлення обладнання

Очікується, що комплексне впровадження запропонованих заходів дозволить знизити загальний об'єм відходів на 30-40% та отримати економічний ефект близько 300 тис. грн на рік [25, 27].

Важливим аспектом є також соціальний ефект - покращення умов праці, підвищення екологічної свідомості працівників та формування позитивного іміджу підприємства як екологічно відповідального виробника [31, 29].

Запропоновані заходи відповідають сучасним тенденціям розвитку екологічно чистих виробництв та вимогам природоохоронного законодавства України [23, 24].

## ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА:

1. Капрельянц, Л. В., Труфкаті, Л. В., & Крупицька, Л. О. (2015). Поживне середовище для культивування бактерій роду *Bifidobacterium* на основі рослинної сировини. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*, 17, №4 (64). <https://core.ac.uk/download/pdf/235837907.pdf>
2. ДП «Ензим». Біфідумбактерин [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://enzim.shop/pharm/bifidumbakterin>
3. НВП «Ариадна». Біфідумбактерин [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ariadna.ua/biopreparati-farmaceutichna-kompaniya-ariadna-zdorov-ya-v-kozhnu-rodinu/bifidumbacterinum>
4. Yu, Y., Lin, S., Chen, Z., Qin, B., He, Z., Cheng, M., Sun, M., & Sun, J. (2023). Bacteria-driven bio-therapy: From fundamental studies to clinical trials. *Nano Today*, 48, 101731. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2022.101731>
5. Pat 9504711 USA. Zincenriched biomass, method for the preparation thereof and probiotic, cosmetic, dietary and nutraceutical products comprising the same /Benedetti A., Cernusco Sul Navigli (IT): Girardo F., Orbassano (IT). Publ. Nov. 29, 2016
6. Kwon, S. G., Son, J. W., Kim, H. J., Park, C. S., Lee, J. K., Ji, G. E., & Oh, D. K. (2006). High concentration cultivation of *Bifidobacterium bifidum* in a submerged membrane bioreactor. *Biotechnology progress*, 22(6), 1591–1597. <https://doi.org/10.1021/bp060236s>
7. Hussain, S. M., Naik, M., Arbaaz Ahmed, L., Udipi, M., & Sukumaran, S. K. (2020). Bioprocess Development for Enhanced Production of Probiotic *Bifidobacterium bifidum*. *Current Science*, 118(2), 280. <https://doi.org/10.18520/cs/v118/i2/280-285>
8. Quigley, E. M. M. (2017). Bifidobacteria as Probiotic Organisms: An Introduction. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*, 125–126. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804024-9.00012-4>
9. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. — 2-е вид., доп. і перероб. — К.: НУХТ, 2010.-63 с

10. Li, L.-Q., Chen, X., Zhu, J., Zhang, S.-Y., Chen, S.-Q., Liu, X., Li, L., & Yan, J.-K. (2023). Advances and challenges in interaction between heteroglycans and *Bifidobacterium*: Utilization strategies, intestinal health and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.02.018>

11. Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., & Matuchansky, C. (2005). Review article: bifidobacteria as probiotic agents - physiological effects and clinical benefits. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 22(6), 495–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02615>.

12. Щорічний звіт про стан здоров'я населення України та епідемічну ситуацію за 2022 рік. Київ, 2023 [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8/%D0%94%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8%202024/%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8%2001-2024/29-01-2024/1/%D0%A9%D0%BE%D1%80%D1%96%D1%87%D0%BD%20%D0%B7%D0%B2%D1%96%D1%82%20%D0%BF%D1%80%D0%BE%20%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BD%20%D0%B7%D0%B4%D0%BE%D1%80%D0%BE%D0%B2%D1%8F%20%D1%82%D0%B0%20%D0%B5%D0%BF%D1%96%D0%B4%D0%B5%D0%BC%D1%96%D1%87%D0%BD%D1%83%20%D1%81%D0%B8%D1%82%D1%83%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%8E%20%D0%B7%D0%B0%202022%20%D1%80%D1%96%D0%BA.pdf>

13. Біфідумбактерин порошок по 0,5 г №10 [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%91%D0%B8%D1%84%D0%B8%D0%B4%D1%83%D0%BC%D0%B1%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BD/1030935/> (дата звернення: 24.10.2024)

14. Hussain, S. M., Naik, M., Arbaaz Ahmed, L., Udipi, M., & Sukumaran, S. K. (2020). Bioprocess Development for Enhanced Production of Probiotic *Bifidobacterium bifidum*. *Current Science*, 118(2), 280. <https://doi.org/10.18520/cs/v118/i2/280-285>

15. Сидоров, Ю. І. (2012). Пілотні ферментери ємнісного типу. *Biotechnology*, 5(2), 68-75.

16. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Метод. Рекомендації до викон. курс. роботи для студ. Напряму 6.051401 «Біотехнологія»

ден. форм. навч. / Уклад.: Т. П. Пирог, Ю.В Карлаш, В.О Красінько . – К.: НУХТ, 2015.

17. Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: підручник / К.:НУХТ, 2009. – 336 с. 35.

18. Головей О. П. , Гуляєв В. М. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О. П., Гуляєв В. М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с.

19. Про охорону праці Стаття 17. Обов'язкові медичні огляди працівників певних категорій. [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://kodeksy.com.ua/pro\\_ohoronu\\_pratsi283\\_new/statja-17.htm](https://kodeksy.com.ua/pro_ohoronu_pratsi283_new/statja-17.htm)

20. Про затвердження Державних санітарних норм та правил "Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною" (ДСанПіН 2.2.4-171-10) Країна: Україна. Тип акта: Наказ. Номер акта: 400. Установа: Міністерство охорони здоров'я України. Дата ухвалення:12 травня 2010 р.

21. Supragingival Microbes. (2015). *Atlas of Oral Microbiology* (p. 41–65). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802234-4.00003-3>

22. Різак Г.В. Курс лекцій з фармацевтичної хімії для студентів мед. ф-ту спеціальності «Фармація». Книга 1. - Ужгород: В- ФОП Сабов А.С. 2022 – 194 с.

23. Постанова від 05.12.2023 № 1279 Про затвердження Порядку створення та адміністрування інформаційної системи управління відходами <https://ips.ligazakon.net/document/view/kp231279?an=1>

24. ПОСТАНОВА від 5 вересня 2023 р. № 947 Про затвердження Порядку розроблення, погодження та затвердження місцевих планів управління відходами. Київ

25. Міністерство захисту довкілля та природних ресурсів України . Нормативно-правова база. <https://mepr.gov.ua/diyalnist/reformy/efektyvne-upravlinnya-vidhodamy/normatyvno-pravova-baza/>

26. Біотехнології в екології : навч. посібник / А.І. Горова, С.М. Лисицька, А.В. Павличенко, Т.В. Скворцова. – Д. : Національний гірничий університет, 2012. – 184 с.

27. Екологічна біотехнологія переробки синьо-зелених водоростей : монографія / Загірняк М. В., Никифоров В. В., Мальований М. С., Самешова Д., Козловська Т. Ф., Єлізаров М. О., Штрбова Е., Шлик С. В., Дігтяр С. В. – Кременчук: ПП Щербатих О. В., 2017. – 104 с.

28. Біотехнологія ХХІ століття: тези доповідей VII Всеукраїнської науковопрактичної конференції, присвяченої 115 річниці заснування НТУУ «КПІ» (Київ, 24 квітня 2013 р.) / Міністерство освіти і науки України, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут». – К.: НТУУ «КПІ», 2013. – 196 с

29. Галузі сучасної біотехнології : підручник для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / Дігтяр С. В., Єлізаров М. О., Мазницька О. В., Никифорова О. О., Новохатько О. В., Пасенко А. В., Сагун О. А. Загальна редакція професора Никифорова В. В. Кременчук: ПП Щербатих О.В., 2021 – 126 с.

30. Мікробні поверхнево-активні речовини у природоохоронних технологіях / Т. П. Пирог, Г. О. Іутинська, А. П. Софілканич, А. Д. Конон. - К. : Наукова думка, 2016. – 278 с.

31. Методичні вказівки до виконання розділу "Охорона праці та навколишнього середовища" кваліфікаційної роботи магістра : для студентів навч.-наук. ін-ту економіки, менеджменту і міжнар. бізнесу / уклад.: В. В. Березуцький [та ін.] ; Нац. техн. ун-т "Харків. політехн. ін-т". – Харків : НТУ "ХПІ", 2020. – 28 с. <https://repository.kpi.kharkov.ua/handle/KhPI-Press/48680>

32. Технологія пробіотиків і вакцин [Електронний ресурс]: лабораторний практикум для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова,

природоохоронна» денної форми навчання./ уклад. С.О. Старовойтова – К.: НУХТ, 2022. – 65 с.

33. Supragingival Microbes. (2015). *Atlas of Oral Microbiology* (p. 41–65). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802234-4.00003-3>

34. Cui, S. M., Zhao, J. X., Liu, X. M., Chen, Y. Q., Zhang, H., & Chen, W. (2016). Maximum-biomass concentration prediction for *Bifidobacterium* in the pH-controlled fed-batch culture. *Letters in Applied Microbiology*, 62(3), 256–263. <https://doi.org/10.1111/lam.12540>

35. Glucose oxidase. Assay protocol [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://prod-docs.megazyme.com/documents/Assay\\_Protocol/K-GLOX\\_DATA.pdf](https://prod-docs.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-GLOX_DATA.pdf)

36. Карлаш, Ю. В. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс] : навч. посібник / Ю. В. Карлаш, В. О. Красінько ; Національний університет харчових технологій. – Київ : НУХТ, 2022. – 373 с.

37. Соломон А.М., Казмірук Н.М., Тузова С.Д. Мікробіологія харчових виробництв: навчальний посібник для студентів напряму підготовки «Харчові технології». – Вінниця: РВВ ВНАУ, 2020. – 312 с.

### **Bioprocess development for enhanced production of probiotic *Bifidobacterium bifidum***

**Suhail Mohammed Hussain, Manali Naik, L. Arbaaz Ahmed, Minal Udipi and Sunil Kumar Sukumaran\***

Anthem Biosciences Pvt Ltd, Bommasandra Industrial Area Phase-I, Hosur Road, Bengaluru 560 099, India

The objective of this study was the development of bioprocess for enhanced biomass production of probiotic *Bifidobacterium bifidum*. In the first process optimization step in Erlenmeyer flasks cultures, different experiments were conducted to study the effect of inoculum volume, inoculum age, temperature and pH of the growth medium on the kinetics of cell growth. In Erlenmeyer flasks cultures, the maximal biomass production was observed with 1% inoculum of 6 log hours at 37°C, and optimal pH of initial media was found to be 6.0. Further positive development in biomass production was observed by scaling up the fermentation process to stirred tank bioreactor. Fermentation was carried out in 2L stirred tank bioreactor, with agitation of 100 rpm and constant temperature of 37°C. The batch culture produced higher biomass of 34.1 g wet cell weight g/l in 12 log hours and viable counts ( $2.5 \times 10^9$  CFU/ml) compared to Erlenmeyer flasks. In conclusion, batch cultivation in the 2 l bioreactor with this growth medium under optimal conditions gives enhanced biomass production. However, based on our end result, high-cell density fed-batch and pH control strategies are recommended for the commercial production of *B. bifidum* as a probiotic.

**Keywords:** *Bifidobacterium bifidum*, bioprocess development, culture condition, probiotics.

The in-house characterized strain of *B. bifidum* was used in the present study. It was initially streaked on MRS agar<sup>14,15</sup> (BD, France) and incubated at  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  under anaerobic condition, using a BD GasPak (BD, France) for 48 h. Next, 20% glycerol stocks were prepared by anaerobically growing an isolated colony in MRS broth (BD, France) at  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  for 72 h and maintained at  $-80$  freezer<sup>16,17</sup>. All the experiments were carried out using the in-house formulated growth medium comprising dextrose monohydrate 15 g/l, peptone 5 g/l, yeast extracts 10 g/l,  $\text{MgSO}_4$  0.050 g/l,  $\text{MnSO}_4$ , 0.020 g/l along with necessary salts (henceforth known as the growth medium).

*B. bifidum* culture was revived from a glycerol vial in 15 ml growth medium and incubated at  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . The culture was inoculated in five Erlenmeyer flasks with the growth medium at the following concentrations (v/v): 1.0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% and 10.0%. The Erlenmeyer flasks were incubated at  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  for 20 h under anaerobic conditions. At every 4-h interval, samples from each flask were checked for pH,  $\text{OD}_{600}$  (ref. 18) and wet cell weight (WCW; g/l) (WCW was recorded as g/l at 13,000 rpm for 15 min)<sup>19</sup>.

was controlled to approx. 0.05. Next, all of the samples were cultured anaerobically at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Strains with unchanging OD values were considered to have been completely inhibited. MIC of each strain and the osmotic pressure of each medium were measured at three biological replicates to assess reproducibility.

#### Analytical procedure

The biomass was quantified by measuring the optical density measured at 620 nm using a spectrophotometer. Spectrophotometric absorbance was correlated with viable bacteria count ( $\text{CFU ml}^{-1}$ ) using a standard curve built from the respective strain.

The samples for measurement of optical-density were diluted to ensure that the measured values were between 0.2 and 0.8. Next, the  $\text{OD}_{620}$  of each sample was calculated as the product of the measured value and the dilution multiple.

The concentration of amino nitrogen in each culture was detected using formol titration (Chen 2003). Osmotic pressure was detected using a freezing-point osmometer (LOSER-OM806M; Löser Messtechnik, Berlin, Germany). The total concentration of organic acids was estimated from the volume of the alkali used for neutralization. Glucose concentration was measured using a glucose oxidase Perid test kit (Rsbio, Shanghai, China), according to the manufacturer's instructions.

## 1. BACKGROUND

Glucose Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric) (ab65333) provides direct measurement of glucose in various biological samples such as, cell lysates, biological fluids and growth medium). The assay is also suitable for monitoring glucose level during fermentation and glucose feeding in protein expression processes. The glucose enzyme mix specifically oxidizes glucose to generate a product which reacts with a dye to generate color ( $\lambda = 570$  nm) or fluorescence (Ex/Em = 535/587 nm). The generated color and fluorescence is proportional to the amount of glucose present in the sample.

The method is rapid, simple, sensitive, and suitable for high throughput. The kit detects 1-10000  $\mu$ M glucose in samples.

### 10.2. For fluorometric assay:

- 10.2.1. Prepare a 1 nmoL/ $\mu$ L Glucose standard by diluting 5  $\mu$ L of the Glucose Standard (section 9.4) in 495  $\mu$ L of Glucose Assay Buffer.
- 10.2.2. Prepare a 0.1 nmoL/ $\mu$ L Glucose standard by diluting 100  $\mu$ L of 1 nmol/ $\mu$ L Glucose Standard with 900  $\mu$ L of Glucose Assay Buffer.
- 10.2.3. Using 0.1 nmoL/ $\mu$ L Glucose standard, prepare standard curve dilution as described in the table in a microplate or microcentrifuge tubes:

Standard #	Volume of Glucose standard ( $\mu$ L)	Assay Buffer ( $\mu$ L)	Final volume standard in well ( $\mu$ L)	End [Glucose] in well (nmoL/well)
1	0	150	50	0
2	6	144	50	0.2
3	12	138	50	0.4
4	18	132	50	0.6
5	24	126	50	0.8
6	30	120	50	1

Each dilution has enough amount of standard to set up duplicate reading (2 x 50  $\mu$ L).