

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

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

« » червня 2022 р.

« » червня 2022 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: Біосинтез біомаси *Lactobacillus delbrueckii* для виробництва
пробіотиків

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 1
ДЕШКО Олександр Леонідович
(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

_____ (підпис)

Керівник КЛЮЧКА Ліля Вікторівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

_____ (підпис)

Консультанти _____
(ім'я та прізвище)

_____ (підпис)

_____ (ім'я та прізвище)

_____ (підпис)

_____ (ім'я та прізвище)

_____ (підпис)

Рецензент ПОКОЙОВЕЦЬ Катерина
(ім'я та прізвище)

_____ (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Освітньо-професійна програма « Біотехнології: фармацевтична
промислова, харчова, природоохоронна»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології
і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 04 ” квітня 20 22 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ДЕШКА Олександра Леонідовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез біомаси *Lactobacillus delbrueckii* для виробництва пробіотиків

керівник роботи КЛЮЧКА Лілія Вікторівна

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-к

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи Біологічний агент: *Lactobacillus delbrueckii*;
цільовий продукт: жувальні таблетки PRO-Dental

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

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва біомаси – 1 аркуш формату А2.

Апаратурна схема виробництва біомаси – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	<i>Характеристика цільового продукту</i>	04.04.2022 – 07.04.2022	
2	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	08.04.2022 – 12.04.2022	
3	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	13.04.2022 – 24.04.2022	
4	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>	25.04.2022 – 02.05.2022	
5	<i>Специфікація обладнання</i>	07.05.2022 – 10.05.2022	
6	<i>Опис технологічної схеми</i>	11.05.2022 – 16.05.2022	
7	<i>Контроль виробництва</i>	17.05.2022- 21.05.2022	
8	<i>Оформлення пояснювальної записки</i>	22.05.2022- 26.05.2022	
9	<i>Виконання графічної частини проекту</i>	27.05.2022 – 01.06.2022	

Здобувач _____ Олександр ДЕШКО
(підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____ Лілія КЛЮЧКА
(підпис) (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячений розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу біомаси *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* PTCC1737, що порівняні з іншими пробіотичними штамми (*L. acidophilus* GK, *L. rhamnosus* BRM 029693) синтезує 5,1 г/л біомаси на досить дешевому середовищі.

Розрахована потужність виробництва становить 55 м³ культуральної рідини на рік, 196,5 кг біомаси. Остання буде виристовуватися як компонент жувальних таблеток, що перешкоджають появі карієсу у дітей.

Технологічний процес біосинтезу біомаси включає допоміжні роботи (приготування 6%-го розчину хлоридної кислоти для підкислення середовища перед стерилізацією, приготування та стерилізація 6%-го розчину гідроксиду натрію для підлужнення середовища, приготування запасних розчинів сульфату феруму та сульфату мангану, стерилізація поживних середовищ) та три стадії вирощування посівного матеріалу та біосинтез у ферментері об'ємом 100 л з коефіцієнтом заповнення 0,7.

Технологія отримання біомаси передбачає культивування продуцента глибинним періодичним способом. Дипломний проект складається з вступу, змісту, семи розділів, списку використаних джерел та технологічної (формат А1) та апаратурної схем (формат А1). Загальний обсяг роботи – 61 сторінок та 11 таблиць.

Ключові слова: *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* PTCC1737, біомаса, жувальні таблетки, карієс у дітей.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	10
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента... 13	
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	15
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	18
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	19
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	20
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	20
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	23
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	24
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	25
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	28
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	29
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	29
4.1.2. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	30
4.1.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	39
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	41
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.....	43
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	51
7.1. Мікробіологічний контроль.....	52

7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	52
7.2.1. Концентрація біомаси.....	52
7.2.2. Концентрація цільового продукту.....	52
7.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	54
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРА.....	58

ВСТУП

На сьогоднішній день важливим питанням є вирішення проблем захворюваності дітей на карієс, що складає 56% всього населення.

На фармацевтичному ринку представлений не дуже широкий вибір продуктів, лікарських засобів, спрямованих на відновлення нормального біоценозу організму людини [1]. Нині пробіотики розглядаються як ефективний метод відновлення складу та функції біоценозу людини. А поява нової науково обгрунтованої інформації з цього питання створює величезні перспективи для поповнення арсеналу фармацевтичного ринку новими ефективними бактеріотерапевтичними препаратами [1].

Пробіотики, крім карієсу, призначаються й ряду інших захворювань: алергії, мігрені, фарингіті, бронхіті та пневмонії, синдромі хронічної втоми, астмі, остеохондрозі, цукровому діабеті, гіпоглікемії, циститі та ін. [2]. З'являються препарати на основі нових, нетрадиційних видів мікроорганізмів, розробляються полікомпонентні пробіотики, пребіотики, синбіотики, препарати, на основі іммобілізованих клітин [1]. Основною групою мікроорганізмів, які використовуються у складі сучасних пробіотичних препаратів є бактерії родів *Bifidobacterium* і *Lactobacterium*. Це пов'язано з тим, що вони є основною мікрофлорою порожнини рота людини [3]. В ході клінічних та експериментальних досліджень встановлено, що лактобактерії пригнічують розмноження патогенної мікрофлори і умовно-патогенної мікрофлори - *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhosa*, *S. schottmuelleri*, *Sarcina lutea*, *Shigella dysenteriae*, *S. paradysenteriae*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *S. lactis*, *Vibrio comma* і ін. [4]

					НУХТ БТЕК 04.02.33 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дешко О.			Вступ	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Ключка Л.В.					8	
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Тому розробка технології одержання пробіотиків є актуальною.

Новизна роботи. Використання штаму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* PTCC1737 як більш вигідніший продуцент біомаси для утворення пробіотиків та як антагоністом відносно широкого кола гампозитивних та грамнегативних бактерій[5].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

На теперішній час однією з гострих проблем є швидке поширення антибіотико-резистентних штамів мікроорганізмів, що є причиною виникнення та поширення інфекційних хвороб у людей [6]. Особливо проблемним є підвищення резистентності до антибіотиків широкого спектру дії, таких як, як фторхінолони та цефалоспорини. Вивчення пробіотичної терапії у даному розрізі проблеми датується ранньою частиною 20 століття, коли вперше були використані молочнокислі бактерії для лікування циститу у жінок. Так, у 1970-х, коли канадський уролог Ендрю Брюс спостерігав зменшення кількості лактобактерій у жінок під час інфекційних захворювань сечовідвідного каналу [7]. У 1982 році було відкрито бактерії *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, що призвело до дослідження їх використання для боротьби з патогенними мікроорганізмами [8].

Практичне використання представників роду *Lactobacillus*

На даний час представників роду *Lactobacillus*, а саме *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. crispatum*, *L. delbrueckii* підтип *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* використовуються у виготовленні пробіотичних препаратів, біологічно активних добавок (БАД) до їжі і пробіотичних продуктів функціонального харчування [8]. Вони активно беруть участь у процесах травлення та метаболізмі лактози про цьому виробляючи β -галактозидазу, гліколазу і молочну дегідрогеназу [7].

Також, такі пробіотичні штами здатні пригнічувати в кишечнику ріст патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів за рахунок здатності утворювати такі речовини, як молочна кислота, лізоцим, бактеріоцини (лактоціни В, F, J, M, лактобrevін, плантаріцин і ін.)

					НУХТ БТЕК 04.02.33 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Дешко О.				РОЗДІЛ. Характеристика кінцевого продукту	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник	Ключка Л.В.						10	
Консультант						9		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П.							

Застосування *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus* знижує ризик виникнення антибіотик-асоційованої діареї у дорослих та дітей. Ефективною є терапія з використанням пробіотиків у лікуванні інфекції, викликаної *Helicobacter pylori*[9]. Також лактобактерії використовують у віднолевленні вагінальної мікрофлори за допомогою замісної гормональної терапії (ЗГТ) [10].

Встановлена ефективність *L. rhamnosus*GGL та *L. gasseri* у лікуванні інфекцій дихальних шляхів. Існують свідчення щодо зменшення проявів симптомів алергічного риніту при вживанні *L. Paracasei*[11]. Доведено терапевтичний ефект *L. rhamnosus* та *L. fermentum* у лікуванні урогенітальних інфекцій [12].

Лактобактерії мають здатність активувати клітинний імунітет і пригнічувати продукцію імуноглобулінів (Ig) класу E. Імуномодуючі дію лактобактерій пов'язують з присутністю в їх клітинній стінки пептидогліканів і тейхоєвих кислот, відомих поліклональних індукторів і імуномодуляторів. До того ж виявлено, що кожен штам лактобактерій надає різний за ступенем вираженості імуномодулюючий ефект [13].

Однак, на даний час, кількість публікацій, що стосуються доказової медицини у використанні таких мікроорганізмів не багато чисельні. Це пов'язано з складністю підбору оптимальних умов культивування пробіотичних штамів, методів отримання готового лікарського препарату (зокрема стадій висушування і вибору захисного середовища) [14]

Вітчизняні препарати на основі представників роду *Lactobacillus*

На українському фармацевтичному ринку представлена розробка компанії «Фармак» Лактіале[®] Уро, що являє собою комплекс пробіотичних культур *Lactobacillus acidophilus* та *Lactobacillus plantarum*. *L. acidophilus* та *L. Plantarum* мають активність щодо поширених у сечовидільній системі патогенів – *Escherichiacoli* та *Enterobacter. faecalis*.

Якісний та кількісний склад препарату Лактіале[®] Уро

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus plantarum* – 5.0×10^8 (КУО)

Екстракт журавлини – 18 мг
проантоціанідін (РАС) – 254 мг,
Вітамін А – 160 мкг

Імунологічні і біологічні властивості

Ці лактобактерії мають високу антагоністичну активність по відношенню до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів (ентеропатогенних кишкових паличок, протей, дизентерійних бактерій, сальмонел, коагулазопозитивних стафілококів та ін.) такислотоутворюючу здатність, тим самим, здійснюють коригуючу дію на мікрофлору кишечника; мають здатність синтезувати вітаміни.

Є дані, що доводять антибактеріальну активність *Lactobacillus acidophilus* щодо грампозитивних та грамнегативних збудників (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.), що було показано в ході досліджень *in vitro*. Бактерицидні властивості *Lactobacillus acidophilus* обумовлені наявністю специфічних антибіотичних речовин, дія яких посилюється в присутності молочної кислоти. У ряді досліджень було показано, що взаємодія лактобактерій з макрофагами стимулює продукцію інтерлейкінів (IL) -1beta, IL-10, інтерферон-гамма (IFN-gamma) і фактора некрозу пухлин (TNF-alpha), які впливають на показники клітинного імунітету. Третій компонент капсул, вітамін А, сприяє нормальному функціонуванню імунної системи та має позитивний вплив на слизові оболонки [15].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТУ

На сьогоднішній день у різних країнах створено велику кількість біологічно активних добавок і лікарських препаратів, основу яких складають культури представників нормальної мікрофлори людини. Як правило, використовуються різні штами біфідо- та лактобактерій, непатогенні штами кишкової палички та ентерококів. Найвідоміші мікроорганізми, що використовуються як основа біопрепаратів – лактобацили. Відомо про використання *Lactobacillus plantarum*, *L. fennentum*, *L. casei*, *L. amylovorus*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. reuleri*, *L. lactis* для виробництва пробіотиків. Лактобактерії мають високу адгезію до слизових оболонок, що сприяє утворенню поверхневого захисного біошару, завдяки чому вони особливо важливі при патології шлунково-кишкового тракту (ШКТ) та уrogenетального тракту. В процесі метаболізму лактобактерії продукують органічні кислоти (більшість молочну), перекиси, антибіотики та бактеріоцини. Утворення цих компонентів розцінюється як критерій антагоністичної активності лактобацил, що забезпечує їх антибактеріальний ефект по відношенню до представників патогенної та умовно-патогенної флори. Визначено, що лактобацили приймають участь у протівірусному імунітеті, зокрема, при реалізації захисту від гепатотропних вірусів, також лактобацили можуть діяти як ад'юванти гуморальної імунної відповіді у людей та експериментальних тварин. Доведено безпосередню активізуючу дію лактобацил на Т-кілери та В-лімфоцити. Наведені дані, що лактобацили мають виражену здатність попереджати загострення виразкового коліту, мати виражений терапевтичний ефект при діарей новонароджених різної патології [16].

					НУХТ БТЕК 04.02.33 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Дешко О.					13	
Керівник		Ключка Л.В.				Кафедра БТМ		
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Отже, лактобацили характеризуються широким спектром властивостей і можуть бути використанні як у харчовій, такі і фармацевтичній промисловості. Для того щоб обрати найкращий біологічний агент, що стане основою про біотичного препарату необхідно порівняти концентрацію синтезованої біомаси, склад поживного середовища та тривалість культивування (табл. 2.1).

Данні, які наведені у таб.2.1 свідчать про те, що штам *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* PTCC1737 утворює найбільшу концентрацію біомаси (5,1 г/л) у порівнянні з іншими *L. acidophilus* DGK та *L.rhamnosus* BRM 029693, що утворюють 4,81 та 2,4 г/л відповідно. При цьому тривалість культивування штаму PTCC1737 є найбільшою (52 год) у порівнянні з іншими штамми для який тривалість вирощування становить 24 год.

На наступному етапі вибору біологічного агента вирахуємо вартість поживного середовища (табл. 2.2). Згідно з інформацією наведеною у табл. 2.2 можна сказати, що вартість поживних середовищ мікроорганізмів майже однакова, найвища для штаму *L.delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* PTCC1737. Тому на останньому етапі вибору біологічного агента ми розрахуємо умовну вартість 1г цільового продукту (табл. 2.3).

Тоді, згідно з даними наведених у табл. 2.3 можна зробити висновок, що *L. acidophilus* DGK є найкращим біологічним агентом, адже вартість 1 л середовища для нього є найнижчою, тривалість культивування становить 24 год, умовна вартість 1 г біомаси є найнижчою (4,2 грв) у порівнянні з іншими продуцентами.

Таблиця 2.1

Обґрунтування вибору біологічного агента для одержання пробіотиків на основі бактерій роду *Lactobacillus*

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год.	Особливості процесу культивування	Джерела інформації
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> PTCC1737	лактоза – 50, пептон – 10, дріжджовий екстракт – 10, C ₂ H ₃ NaO ₂ – 5,0, KH ₂ PO ₄ – 2; MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0.2; MnSO ₄ ×4H ₂ O – 0,05; FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,03	5,1	52	Температура культивування 37°C, швидкість перемішування 50 об/хв	Rezvani F., Ardestani F., Najafpour G. Growth kinetic models of five species of <i>Lactobacilli</i> and lactose consumption in batch submerged culture. <i>J. Brazil. Microbiol.</i> 2017. doi: 10.1016/j.bjm.2016.12.007[17]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DGK	глюкоза – 10, дріжджовий екстракт – 10, соевий пептон – 10, цитрат амонію – 2, MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,2, CH ₃ COONa – 5, MnSO ₄ ×4H ₂ O – 0,05, кукурудзяний екстракт – 10 мл/л	4,81	24	Температура культивування 37°C, без перемішування	Chin-Fa H., Chien-Ku L., Shin-Yi Y., Ren-Han C., & Hau-Yang T. Enhancement of biomass production and nutrition utilization by strain <i>Lactobacillus acidophilus</i> DGK derived from serial subculturing in an aerobic environment. <i>African J. Biotechnol.</i> 2015; 14(3), 248–256. doi: 10.5897/ajb2013.12839 [18]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BRM 029693	глюкоза – 10, пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, цитрат амонію – 2, MgSO ₄ ×7H ₂ O – 2	2,4	24	Культивування здійснювали у ферментері об'ємом 3 л (робочий об'єм – 2 л), температура культивування 37°C, pH 5,6	Freitas R.M., Carvalho J.D.G., Bruno L.M. Pinto G.A.S. Production de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> BRM 029693 in feed-batch fermentations. <i>Research, Society and Development.</i> 2020; 9(7): DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd [19]

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів

Біологічний агент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента грн./кг	Вартість компонента(грн) на 1л середовища	Джерело інформації
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> PTCC1737	лактоза – 50	44	2,2	20
	пептон 10	850	8.5	21
	дріжджовий екстракт– 10	1100	11	22
	натрій оцтовокислий $C_2H_3NaO_2$ – 5,0	60	0.3	23
	KH_2PO_4 – 2	100	0.2	24
	$MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.2	14	0.3	25
	$MnSO_4 \times 4H_2O$ – 0,05	10	0.0001	26
	$FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,03	38	0.000025	27
Вартість 1 л середовища - 22.5 грн				
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DGK	глюкоза –10	33	0.033	28
	дріжджовий екстракт – 10	1100	11	22
	соевий пептон – 10	750	7.5	29
	цитрат амонію – 2	900	1.8	30
	$MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2	14	0.3	25
	CH_3COONa – 5	49	0.245	25
	$MnSO_4 \times 4H_2O$ – 0,05	10	0.0001	26
	кукурудзяний екстракт – 10 мл/л	60	0.6	31
Вартість 1 л середовища – 20.4 грн				
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BRM 029693	глюкоза – 10	33	0.033	28
	пептон – 10	850	8.5	21
	дріжджовий екстракт – 5	1100	11	22
	цитрат амонію – 2	900	1.8	30
	$MgSO_4 \times 7H_2O$ – 2	14	0.007	25
Вартість 1 л середовища – 21.3 грн				

Умовна вартість 1 г біомаси, синтезованих представниками роду

Lactobacillus

Біологічний агент	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> PTCC1737	5,1	52	22,5	4,4
<i>L. acidophilus</i> DGK	4,81	24	20,4	4,2
<i>L. rhamnosus</i> BRM 029693	2,4	24	21,3	8,8

Розрахунок поживного середовища для біосинтезу біомаси *L.**delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* PTCC1737

Склад поживного середовища, г/л:

лактоза – 50 ,

пептон - 10,

дріжджовий екстракт– 10,

$C_2H_3NaO_2$ – 5,0,

KH_2PO_4 – 2;

$MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.2;

$MnSO_4 \times 4H_2O$ – 0,05;

$FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,03.

Вміст вуглецю в біомасі бактерій становить 50 % від маси сухої речовини. Для визначення рівня біомаси, якого можна досягнути під час культивування бактерій на середовищі з 50 г/л лактози, потрібно спочатку розрахувати вміст елементного вуглецю. Молекулярна маса лактози – $C_{12}H_{22}O_{11}$ – становить 342,3 г/моль. Отже, у 342,3 г лактози міститься $12 \times 12 = 144$ г вуглецю, а в 50 г цього вуглеводу вміст вуглецю дорівнює $(50 \times 12) / 342,3 = 1,7$ г. Якщо у біомасі міститься 50% вуглецю, то з 1,75 г вуглецю можна одержати 3,5 г/л біомаси.

Дріжджовий екстракт містить у своєму складі 30-40% глюкози. Розрахуємо кількість глюкози яка міститься в дріжджовому екстракті.

$$10 - 100\%$$

$$x - 30\%$$

$x = 3$ г кількість глюкози містить 10 г дріжджового екстракту.

Молекулярна маса глюкози – $C_6H_{12}O_6$ – становить 180 г/моль. Отже, у 180 г глюкози міститься $12 \times 6 = 72$ г вуглецю, а в 3 г глюкози (дріжджового автолізу) вміст вуглецю дорівнює $(3 \times 72) / 180 = 1,2$ г. Якщо у біомасі міститься 50% вуглецю, то з 1,2 г вуглецю можна одержати 2,6 г/л біомаси.

Отже, сумарна кількість біомаси, яку можна отримати з лактози і дріжджового автолізу становить $3,5 + 2,6 = 6,1$ г/л.

Вміст азоту в біомасі бактерій становить 10–14 % від маси сухої речовини. Для визначення рівня біомаси, якого можна досягнути під час культивування бактерій на середовищі з 10 г/л пептону, потрібно спочатку розрахувати вміст елементного азоту в даній сполуці. Молекулярна маса пептону – $C_{15}H_{11}N_3O$ – становить 249,27 г/моль. Отже, у 249,27 г пептону міститься 42 г азоту, а в 10 г цієї сполуки вміст азоту дорівнює $(10 \times 42) / 249,27 = 1,6$ г. Якщо у біомасі міститься 10% азоту, то з 1,6 г азоту можна одержати 16 г/л біомаси.

Отже, в даному випадку лімітувальним фактором виступає вміст карбону в середовищі. Теоретично можливий рівень біомаси – 6,1 г/л.

2.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Нерухомі, неспортовані грампозитивні бактерії розміром $0,5-0,8 \times 2,0-9,0$ мкм. Хемоорганогетеротрофи, мікроаерофіли. Енергію отримують у результаті гомоферментативного молочнокислого бродіння. Для зростання на поживних середовищах потребують фактори росту та вітаміни. Мають набір протеаз, що беруть участь у дозріванні деяких сортів сирів [32], специфічна пептидаза *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* -

пролідаза гідролізує білки з високим вмістом пролінута має унікальні шляхи регуляції біосинтезу білка [33].

Також синтезує пептидоглікангідролазу – специфічний фермент, відповідальний за гідроліз пептидоглікану, важливого компонента клітинної стінки бактерій [34]. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* продукує позаклітинні полісахариди [35,36], що покращують структуру, що підвищують стабільність і запобігають синерезису йогурту [37]. Бактерія виявляє імуностимулюючу дію [38] і здатна виживати при проходженні черезшлунково-кишковий тракт [39,40]. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* розчеплює лактозу на глюкозу та галактозу. Після чого глюкоза каталізується у піруват за допомогою гліколізу, а потім останій за допомогою ацетил-КоА залучається до ЦТК (цикл трикарбонових кислот).

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Lactobacillus delbrueckii subsp. *Bulgaricus* – підвид *Lactobacillus delbrueckii*, одна з бактерій що використовуються для виробництва йогурту. Раніше бактерія була відома як вид *Lactobacillus bulgaricus*, названа на честь Болгарії, в якій була вперше відкрита та використана.

Домен: Бактерії

Тип: Фірмікути

Клас: Бацили

Порядок: *Lactobacillales*

Сімейство: *Lactobacillaceae*

Рід: Лактобацили

Вид: *Lactobacillus delbrueckii*

Підвид: *bulgaricus* [41].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1 Потреба у цільовому продукті

Карієс раннього віку залишається найпоширенішим хронічним дитячим захворюванням. Щорічно у світі реєструється близько 1,8 млрд. нових випадків. Вже у трирічних дітей ураження зубів карієсом може досягати 32%. Здоров'я порожнини рота відбивається на загальному стані організму та якості життя дитини. Довго протікають патологічні процеси, особливо в період росту та розвитку зубощелепної системи, призводять до порушення формування тканин зубів та раннього руйнування комплексу пародонту. У сучасній етіології карієсу провідна роль відводиться карієсогенної мікрофлори. Крім цього значення мають рівень стоматологічних знань батьків, їхня прихильність до профілактичних візитів та лікування тимчасових зубів. На підставі проведеного огляду літератури встановлено, що з метою профілактики та лікування карієсу та захворювань пародонту актуальне використання препаратів із живими пробіотичними бактеріями[23,22].

На відміну від інших інгредієнтів харчових продуктів або лікарських засобів живі пробіотики мають потенціал інфекційності *in situ* [24]. Пробіотики беруть участь у підтримці здоров'я ротової порожнини за рахунок взаємодії з мікробіомом і сприяють стабілізації мікробної рівноваги. Природа та склад будь-якого окремого мікробіома впливають на загальний стан здоров'я.

До основних процесів, що забезпечують позитивні ефекти пробіотиків, відносяться:

- інгібування зростання потенційно шкідливих мікроорганізмів внаслідок продукції антимікробних субстанцій та активації імунокомпетентних клітин;

					НУХТ БТЕК 04.02.33 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Дешко О.					20	
Керівник		Ключка Л.В.						
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
						Кафедра БТМ		

- стимуляція зростання представників мікрофлори внаслідок продукції вітамінів та інших ростостимулюючих факторів;
- нейтралізація токсинів та нормалізація рН;
- зміна мікробного метаболізму, що виявляється у підвищенні чи зниженні активності ферментів [25].

Клінічно доведена ефективність використання пробіотиків при карієсі у дітей. У ході дослідження [26] відзначалися зниження рівня обнасінення зубів основною карієсогенною флорою та частоти виділення *Streptomyces mutans* на 37,8%. Крім того, вірогідно збільшилася частота виділення антагоністів карієсогенної флори: *S. salivarius* - 100% випадків, *Enterococcus spp.* - 50%, *Veillonella spp.* - 35,7%, *Corinebacterium spp.* - 14,2% випадків [27]. Аналогічний результат було встановлено у дослідженні [28], використання пробіотичних штамів супроводжувалося зменшенням накопичення зубного нальоту та нейтралізацією кислотності порожнини рота у дітей.

У рандомізованому подвійному сліпому плацебо контрольованому дослідженні брало участь 100 дітей з карієсом зубів, які отримували препарат на основі *Streptococcus salivarius* M18 протягом трьох місяців. Критеріями ефективності були зміни кількості зубного нальоту, оцінка пародонтальних індексів, а також мікробіологічна частина. Після закінчення лікування кількість зубних бляшок у дітей значно знизилася, особливо у групі із незадовільним індексом гігієни порожнини рота.

Вчені зробили висновок, що *S. salivarius* M18 при регулярному пероральному прийомі нормалізує мікробіоту ротової порожнини, не надаючи негативного впливу на нормальну флору ротової порожнини [29, 30].

Тому у даному курсовому проєкті ми пропонуємо використання біомаси пробіотичних мікроорганізмів для профілактики карієсу у дітей.

Так, станом на 2020 рік в Україні на карієс зареєстровано у 237 чоловік на 100 тис. населення [31]. При цьому кількість населення України у 2020 році становила 42 064 377 осіб [32]. Тоді загальна кількість хворих:

$$N_{\text{хв}} = 42\,064\,377 \times 237 / 100\,000 = 98\,437 \text{ тис. хворих.}$$

З яких частка дітей до 18-ти років приблизно становить 56 %, відповідно дорослі становлять 44 %.

Хворих дітей: $N_{\text{дт}} = 98\,437 - 43\,312 = 55\,125$ осіб.

Як основу для розрахунків потреби у пробіотичному препараті опиратимемося на закордонний аналог – жувальні таблетки PRO-Dental, одній дозі міститься 170 мг клітин предстаників роду *Lactobacillus*.

Так як ефективність клінічного використання *Lactobacillus delbrueckii* доведена [33] пропонуємо виготовляти жувальні таблетки на основі цих мікроорганізмів.

Так, згідно рекомендацій до використання період профілактики для дітей різного віку становить 20 днів, 2-3 таблетки на день, після чищення зубів. В 1 таблетці кількість біомаси лактобактерій становить 170 мг.

Узагальнені дані для розрахунку наведені у таблиці 3.1

Таблиця 3.1

Узагальнені дані щодо потреби у біомасі для профілактики карієсу у дітей

Категорії хворих	Кількість хворих на рік	Кількість мг біомаси в 1 таблетці	Кількість г біомаси на курс* на 1 дитину	Кількість кг біомаси на курс* на всіх дітей	Загальна необхідність у біомасі, кг
Діти від 1 до 3 роки	11 030	170	6,8	75,0	491,2
6-7 років	9 850		6,8	66,9	
8-12 років**	14 785		10,2	150,8	
13-18 років**	19 460		10,2	198,5	

Примітка: *- курс складає 20 днів, **-кількість таблеток на добу 3 шт

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Враховуючи відсутність вітчизняних препаратів, низьку обізнаність населення у наявності подібних препаратів і наявність 1-го закордонного засобу, забезпечуватимемо потребу у 50 %, (тобто 245,6 кг біомаси).

$$491,2 \text{ кг} - 100\%$$

$$X \text{ кг} - 40\%$$

Звідси, $X = 40 \times 491,2 / 100 = 196,5 \text{ кг}$ – біомаси потрібно виготовити на 1 рік.

Враховуючи що *Lactobacillus delbrueckii* синтезує 5,1 г/л біомаси [33], розрахуємо потужність виробництва культуральної рідини для отримання 196,5 кг біомаси:

$$1 \text{ м}^3 - 5,1 \text{ кг}$$

$$X \text{ м}^3 - 196,5 \text{ кг}$$

$$X = 38,5 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини на рік.}$$

Враховуючи сумарні витрати цільового продукту при виділенні (30%), необхідно отримати таку кількість препарату:

$$V_{\text{п}} = 38,5 / 0,7 = 55 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини/рік.}$$

Отже, потужність виробництва становить 55 м^3

3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Для повного забезпечення біомасою, потрібно одержати (з урахування втрат для виділення) m^3 культуральної рідини (див. підрозділ 3.2.).

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Тому, приймаємо кількість трудоднів 230 (в інші дні виробництво буде працювати на отримання біомаси для інших потреб), тоді кількість продукту за добу становить:

$$V_d = V_{гп} / T_{тр} = 55/230 = 0,23 \text{ м}^3$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{кр} = (K_1 \cdot V_d \cdot T_{цф})/24 = (1,1 \cdot 0,23 \cdot 60)/24 = 63 \text{ л/цикл},$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (52 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (1 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,0 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу у виробничому ферментері з врахуванням втрат при біосинтезі $E_{ф} = 0,1$ становить:

$$V_{ф} = V_{кр}/(1-E_{ф}) = 63/(1-0,1) = 70 \text{ л}.$$

Одержані значення культуральної рідини, ми використовуємо для розрахунку геометричного об'єму ферментера:

$$V_r = V_{цк} / K_{зап} = 70/0,7 = 100 \text{ л}.$$

Обираємо за таблицею ферментер з геометричним об'ємом 100 л.

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 70$ л культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб.1} = V_{кр}/(1-Eф) = 62/(1-0,1) = 69,2 \text{ л,}$$

де $Eф$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 69,2$ л.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,7$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{ф}$), що становить

$$V_{ф} = V_{роб.1}/K_{зап} = 69,2/0,7 = 98,8 \text{ л.}$$

Приймаємо що найближчий за об'ємом ферментер рівний $V_{сф} = 1 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап1} = V_{роб.1}/V_{сф} = 69,2/0,7 = 98,8.$$

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

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1}/(1+Xф) = 69,2/(1+0,1) = 62,9 \text{ л,}$$

де $Xф = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 69,2 - 62,9 = 6,3 \text{ л.}$$

Для одержання 6,3 лінокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті культивування кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1}/(1-Eпа) = 6,3/(1-0,1) = 7 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 7 / (1 + 0,1) = 6,3 \text{ л,}$$

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

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 7 - 6,3 = 0,7 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.2}} = 7$ л можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{\text{па2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап}} = 7 / 0,7 = 10 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 10$ л.

Для одержання 0,7 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті біосинтезу, тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 0,7 / (1 - 0,3) = 1 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 1 / (1 + 0,1) = 0,9 \text{ л,}$$

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

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 1 - 0,9 = 0,1 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.3}} = 1$ л можна одержати під час культивування бактерій в інокуляторі геометричним об'ємом

$$V_{\text{ін3}} = V_{\text{роб.3}} / K_{\text{зап}} = 1 / 0,7 = 1,4 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сф}} = 3$ л.

Для одержання 1,4 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті біосинтезу, тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в малому інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 0,1 / (1 - 0,1) = 0,11 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) для малого інокулятора становить 10 % від об'єму поживного середовища в малому інокуляторі. Тоді кількість поживного середовища в малому інокуляторі буде становити:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 0,11 / (1 + 0,1) = 0,1 \text{ л,}$$

де $X_{ін} = 0,10$ –доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 0,9 - 0,8 = 0,1 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.4} = 0,9$ л можна одержати під час культивування бактерій в малому інокуляторі геометричним об'ємом

$$V_{ін4} = V_{роб.4}/K_{зап} = 0,9/0,7 = 1,2 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчі за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 3$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.4}/V_{сф} = 0,9/3 = 0,3.$$

Для одержання посівного матеріалу $V_{пм4} = 0,3$ л для засіву малого інокулятора можна культивуванням бактерій в колбах. Для цього використовують колби об'ємом $V_{колб} = 500$ мл з коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,7$.

Тоді кількість колб становить:

$$N_{колб} = V_{пм4}/(V_{колб} \cdot K_{зк}) = 0,3/500 \cdot 0,7 = 1 \text{ колб.}$$

Отже, процес підготовки інокуляту для виробничого біосинтезу у 100 л ферментері з коефіцієнтом заповнення 0,7 буде проходити у 4 стадії.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus PTCC 1737 є анаеробним організмом, оптимальна температура для нього є 37°C та рН 6,5. Даний мікроорганізм культивують з метою отримання біомаси. Тому є ризик контамінації мезофільними мікроорганізмами, тому культивування проводять у асептичних умовах. Так як, асептичних умов не можливо досягти при поверхневому культивуванні, отже використовується глибинне культивування. Вирощування *L. delbrueckii* відбувається періодично тому що кінцевим продуктом є біомаса, найвища концентрація якої досягається вже на 52 годину культивування [33].

					НУХТ БТЕК 04.02.33 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дешко О.			РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Ключка Л.В.					28	
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

4.1.1. Обґрунтування типу ферментера для культивування

Lactobacillus delbrueckii

1. Ферментер має бути оснащений газаналізатором, для визначення рівня CO₂ який утворюється у процесі життєдіяльності;

2. Для інтенсифікації масообмінних процесів необхідний перемішувач пристрій з регульованою частотою обертів;

3. Потрібен датчик температури та сорочка для забезпечення сталої температури;

4. Має бути оснащений рН-метром у зв'язку з тим що у процесі вирощування представники роду *Lactobacillus* здатні утворювати молочну кислоту як побічний продукт.

5. Поживне середовище не містить речовин які піняться, інтенсивність перемішування є малою відповідно фізичними або хімічного піногасника у ферментері не повинно бути, як і барботера, тому що, *L. Delbrueckii* є анаеробом.

Отже усім вимогам відповідає ферментер компанії «BIORUS» (рис 4.1).

Загальний об'єм: 100 літрів, робочий – 70 л, відношення діаметра до висоти: 1: 2,5, коефіцієнт заповнення: 70%

Ферментер виготовлений з нержавіючої сталі марки 316L відповідно до стандарту GMP, всередині посудини відсутні «мертві зони», є спеціальний стерилізується пробовідбірник, спеціальний пристрій для стерильного засів, завантажувальний клапан, трубопровід для перекачування. Для контролю за рівнем рідини передбачене оглядове вікно з великим кутом огляду, порти для датчиків рН, рівнеміраї кілька запасних каналів.



Рис. 4.1.Пилотный ферментер для глубинного культивирования

4.1.2. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

У сучасному виробництві продуктів харчування вимоги до санітарного стану постійно підвищуються. Але в той же час підвищуються і стандарти біологічної та екологічної безпеки. Виробникам все важче стає знайти оптимальний баланс між ефективністю і безпекою дезінфікуючих засобів, які часто містять небезпечні для здоров'я хімічні речовини.

Було обрано такі миючі засоби:

Дезінфікуючий засіб "ДИСМОЗОН® ПУР"

Форма випуску: концентрат – порошок може бути у гранулах або у таблетках.

Антимікробна активність:

Бактерициден (вкл. MRSA/ЕНЕС, збудників туберкульозу, легіонельозу), фунгіциден (вкл. гриби роду *Candida* та гриби на вологому дереві), віруліциден (вкл. збудників парентеральних гепатитів В, С, ВІІ та рота-, вакцина- папова-, поліовіруси, SARS-CoV), спороциден (*Clostridiumdifficile*, *Bacillusubtillis*).

Властивості:

Засіб добре змішується з холодною водою. Дисмозон® пур пройшов успішні випробування та сертифікований, як придатний для найрізноманітніших матеріалів: макролон/акрилове скло, глиняні/кам'яні

плитки, зуболікарський матеріал для відбитків, полівінілхлорид, поліпропілен, лінолеум, гума, сталь, алюміній, мідь, латунь, галь .

Застосування:

Дисмозон® пур поставляється у вигляді гранул у пакетах, які дозволяють здійснювати просте та надійне дозування: 1 пакетик Дисмозон пур = 3 літри 1% робочого розчину. При приготуванні робочого розчину рекомендуємо розчинити гранулят у невеликому обсязі води, а потім додати необхідну кількість води. Для приготування розчинів завжди використовувати холодну воду (максимум кімнатної температури).

Щоб гарантувати повну мікробіологічну ефективність продукту, для підтримки необхідного рівня вмісту активного кисню у розчині робочий розчин необхідно щодня оновлювати.

Способи обробки:

Дисмозон® пур використовується для дезінфекційного очищення (миття) у різних медичних закладах. Він придатний для обробки медичного обладнання згідно із Законом про медичне обладнання (MPG) та для інших поверхонь, що миються. Завдяки своїй мікробіологічній дії та наявності специфічно активних речовин (ММРР) цей продукт рекомендується для рутинного застосування на чутливих ділянках та в найближчому оточенні пацієнтів:

- відділення інтенсивної терапії;
- діалізні відділення;
- хірургічні відділення;
- акушерські відділення;
- відділення для недоношених немовлят;
- діагностичні відділення, які проводять хірургічні втручання;
- опікові відділення;
- фізіотерапевтичні відділення;
- місця для купання, включаючи ванни;
- санітарні та кухонні приміщення.

Дисмозон пур застосовується також для дезінфекції чистих приміщень класу А та В на фармацевтичних підприємствах .

Засіб БАЦИЛОЛ АФ (бацилол) - прозорий безбарвний розчин зі спиртовим запахом.

Розчин готовий до застосування. Відносна густина (20°C) – 0,853-0,857 г/см³, показник заломлення – 1,373-1,379, значення рН – близько 6,0. Температура займання 25°C. Засіб добре змішується з водою, добре змочує поверхні, швидко висихає, не утворюючи залишку. Засіб не пошкоджує об'єкти, виготовлені з металу, скла, гуми, має миючі властивості, добре розчиняє та видаляє білкові, жирові та інші органічні забруднення. Засіб не призначений для дезінфекції поверхонь, покритих розчинними у спиртах лаками, об'єктів, які виготовлені з акрилового скла (плексигласу), нітрильного каучуку та інших матеріалів, чутливих до дії спиртів. Засіб біологічно розпадається.

Засіб БАЦИЛОЛ має:

- бактерицидні властивості, в тому числі по відношенню до MRSA/ЕНЕС (MRSA – мультирезистентний золотистий стафілокок (*Staphylococcus aureus*) ЕНЕС – ентерогеморагічна кишкова паличка (*Proteus mirabilis*, збудників лістериозу, бруцельозу, лептоспірозу та сальмонельозу та ін. (атестований згідно з Європейськими стандартами EN 13727, EN 13697); туберкулоцидні властивості, у т. ч. стосовно *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis* (;
- фунгіцидні властивості, у тому числі стосовно *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton gypseum* та ін.;
- віруліцидними властивостями, у т. ч. по відношенню до збудників вірусних гепатитів В і С, ВІЛ-інфекції, вірусів герпесу тип 1, вакциновірусів та інших оболонкових вірусів, а також поліома-, рота-, адено-, норовірусів та ін. згідно з Європейським стандартом EN 14476).

СТЕРИЛЛУМ® КЛАСІК ПУР - спиртовий антисептик для рук з ефектом, що захищає шкіру.

Властивості:

- широкий спектр антимікробної дії;
- швидкодіючий препарат з пролонгованою дією протягом 1 години на незахищеній шкірі рук та протягом 3-х годин під медичними рукавичками;
- ефективний проти резидентної мікрофлори;
- зниження транзиторної флори на понад 99,99% за 30 секунд;
- атестований за європейськими стандартами prEN 12791, EN 1500;
- виключно гарна переносимість шкірою навіть при довготривалому застосуванні;
- відмінні захист та догляд за шкірою;
- антисептика рук може проводитися в будь-якому місці, незалежно від того, чи є там умивальник і вода.

Області застосування:

- Застосовується для гігієнічної та хірургічної (передопераційна антисептика) антисептики рук та антисептичної обробки шкіри перед ін'єкціями та пункціями, у різних галузях медицини та в побуті:
 - у лікувальних закладах та лікарській практиці всіх профілів;
 - у функціональних відділеннях (операційні, відділення інтенсивної терапії, інфекційні лікарні);
 - в амбулаторіях та лабораторіях;
 - при домашньому догляді за хворими, старими та немовлятами;
 - у промисловості (фармацевтичне, косметичне, мікробіологічне виробництво, виробництво продуктів харчування);
 - у дитячих дошкільних закладах, у громадському харчуванні та торгівлі, на всіх видах транспорту, комунальних об'єктах тощо.

Мікробіологічна активність:

Бактерії, гриби, мікобактерії туберкульозу, віруси (гепатит В і С, ВІЛ, віруси герпесу типів 1 та 2, поліомавіруси, ротавіруси, вакциніявіруси, вірус грипу А та ін.).

КУТАСЕПТ® Гпрозорий розчин червоно-коричневого кольору із запахом спирту, густина – приблизно 0,88 г/см³, рН – біля 8,0;

Препарат має пролонговану бактерицидну (у т. ч. по відношенню до MRSA/ЕНЕС¹⁾ та інших антибіотико резистентних бактерій), фунгіцидну, туберкулоцидну дію. Інактивує віруси гепатиту В, ВІЛ, герпесу типу 1, рота віруси та ін. Спиртова складова препарату одночасно із швидким ефектом антимікробної дії забезпечує знежирююче очищення шкіри, а також проникнення бензалконіохлориду у глибші шари шкіри, за рахунок чого забезпечується пролонгована дія препарату. Також сприяє ефективному прилипанню хірургічної плівки.

СТЕРАНІОС

Універсальний дезінфікуючий засіб у вигляді прозорої рідини зеленого кольору з запахом віддушки. За параметрами гострої токсичності згідно з ГОСТ 12.1.007-76 відноситься до 4 класу малонебезпечних речовин при введенні в шлунок, нанесення на шкіру та при інгаляційному впливі летких компонентів засобу; до 5 класу практично нетоксичні речовини при введенні в черевну порожнину. Засіб при одноразовому впливі має слабку місцево-подразнюючу дію на шкіру; при багаторазових нанесеннях – помірна шкірно-дратівлива дія. Засіб надає помірно дратівлива дія на слизову оболонку очей, не володіє шкірно-резорбтивним і сенсibiliзуючою дією.

Застосування засобу дезінфекція та стерилізація:

- виробів медичного призначення, виготовлених із різних матеріалів, у т.ч. хірургічних, стоматологічних та інших інструментів, лабораторного посуду в установах охорони здоров'я;
- виробів медичного призначення з термостабільних та термолабільних матеріалів, включаючи жорсткі та гнучкі ендоскопи та інструменти до них;
- інструментів на підприємствах фармацевтичної, косметологічної та мікробіологічної промисловості;
- Інструментів в установах комунально-побутового призначення (манікюрні, педикюрні, косметологічні кабінети, перукарні).

АНИОСЕПТ АКТИВ

Концентрат у вигляді дрібнодисперсного порошку білого кольору з легким характерним запахом, добре розчиняється у воді. Засіб не має окисних властивостей. Засіб застосовується як водних робочих розчинів. Робочий розчин АНИОСЕПТ АКТИВ UA - прозора безбарвна рідина з легким характерним запахом, рН 1,0% робочого розчину 8,0-11,0. Робочі розчини засобу мають хороші миючі властивості, не викликають корозії виробів із нержавіючої сталі. Не ушкоджують поверхні зі скла, полімерних матеріалів, гуми, дерева, кахлю, фарфору, фаянсу. Робочі розчини добре змиваються, не залишаючи нальоту та плям на поверхнях об'єктів, що обробляються. Видаляють неорганічні та органічні забруднення, включаючи білкові, жирові забруднення, залишки крові, залишки лікарських засобів із зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів виробів медичного призначення, що гомогенізують мокротиння та інші виділення. Робочі розчини засоби застосовують для миття та дезінфекції інструментів в ультразвукових ваннах. Розчини засоби використовують для дезінфекції поверхонь вологого дерева від цвілевих грибів. Засіб не придатний для поверхонь виробів виготовлених з алюмінію, латуні, міді та сталі з гальванічним, титановим та карбідом вольфрамовим покриттями. Концентрат засобу стабільний при температурі від +5°C до +30°C. Засіб біологічно розпадається.

4.1.3 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Lactobacillus delbrueckii

Виробниче культивування для накопичення біомаси *Lactobacillus delbrueckii* здійснюють в 100 л ферментері з коефіцієнтом заповнення 0,7.

Робочий об'єм ферментера становить:

$$V_{\text{роб}} = V_{\text{г.ф}} \times K_{\text{зап}}$$

де: $V_{г.ф.}$ – геометричний об'єм ферментера;

$K_{зап}$ – коефіцієнт заповнення.

$$V_{роб} = 100 \times 0,7 = 70 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 70 л культуральної рідини потрібно:

$$V_{роб.1} = 70 \times 0,1 = 7 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Для отримання такої кількості посівного матеріалу можна використати інокулятор об'ємом 10 л.

Для засіву інокулятора для одержання 7 л культуральної рідини необхідно:

$$V_{роб.2} = 7 \times 0,1 = 0,7 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати при культивуванні у колбі об'ємом 1 л.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого культивування *Lactobacillus delbrueckii* 100 л ферментері з коефіцієнтом заповнення 0,7 буде проходити у 2 етапи: Отримання інокуляту у колбі об'ємом 1л та отримання інокуляту в інокуляторі об'ємом 10л.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для культивування *Lactobacillus delbrueckii*

Для отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* PTCC1737 використовується середовище такого складу (г/л):

лактоза – 50 ,

пептон– 10,

дріжджовий екстракт– 10,

$C_2H_3NaO_2$ – 5,0,

KH_2PO_4 – 2;

$MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.2;

$MnSO_4 \times 4H_2O$ – 0,05;

$FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,03.

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 100 л з коефіцієнтом заповнення 0.7. Підготовка посівного матеріалу відбувається у дві стадії (в колбі та у інокуляторі об'ємом 10 л). Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбі будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм невеликий (0.7 л), для вирощування в інокуляторі об'ємом 10 л та виробничого біосинтезу – безпосередньо у самих апаратах.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу для вирощування в колбі

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

Композиція А: лактоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30-40 хв);

Композиція Б: пептон (режим стерилізації: 120 °С, 20 хв);

Композиція В: KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 45 хв);

Композиція Г: $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131 °С, 45 хв).

Тому як концентрація солей $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ та $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ є дуже малою і не можливо для даного етапу зважити ці солі тому готуються запасні розчини, які стерилізують в автоклаві при 131 °С упродовж 40 хв.

Таблиця 4.1

Розрахунок вмісту мікроелементів в різних об'ємах поживного середовища

Об'єм середовища, л	Вміст мікроелементів	
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0.7	0.035 г	0.021 г
7	0.35 г	0.21 г
70	3.5 г	2.1 г

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

На даному етапі необхідно приготувати 7 л поживного середовища. Композиція А: лактоза, дріжджовий екстракт(режим стерилізації: 112 °С, 30-40 хв);

Композиція Б:пептон (режим стерилізації: 120 °С, 20 хв);

Композиція В: KH_2PO_4 , $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131°С, 45 хв).

Композиції А та Б стерилізують у автоклаві, солі ж будуть стерилізуватися безпосередньо у інокуляторі об'ємом 10 л. Для того щоб простерилізувати солі разом потрібно приготувати не стерильний розчини НСІ концентрацію 6%, який вносять у поживне середовище перед стерилізацією та стерильний 6%-й розчин NaOH.

Таблиця 4.2

Розрахунок вмісту та особливості приготування титрувальних агентів

Об'єм середовища, л	НСІ (6%)		NaOH	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0.7	-	-	-	-
7	14	у колбі на 50 мл	14	у колбі на 50 мл
70	140	у колбі на 250 мл	140	у колбі на 250 мл

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання виробничого біосинтезу

На даному етапі необхідно приготувати 70 л поживного середовища. Композиції для його приготування:

Композиція А: лактоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30-40 хв);

Композиція Б: пептон (режим стерилізації: 120 °С, 20 хв);

Композиція В: KH_2PO_4 , $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131 °С, 45 хв).

Композиції А та Б стерилізують у збірниках, солі ж будуть стерилізуватися безпосередньо у ферментері об'ємом 100 л. Для того щоб простерилізувати солі разом потрібно приготувати не стерильний розчин НСІ концентрацію 6%, який вносять у поживне середовище перед стерилізацією та стерильний 6%-й розчин NaOH.

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає такі додаткові стадії:

- приготування 6% розчину НСІ для підкислення середовища при стерилізації його в інокуляторі об'ємом 10 л та ферментері 100 л;
- приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для стабілізації рН середовища перед початком культивування в інокуляторі об'ємом 10 л та ферментері 100 л;
- приготування та стерилізація розчину мікроелементів для вирощування посівного матеріалу в колбі та посівному апараті на 10 л.

Крім того необхідно передбачити такі збірники:

- збірники для розчинення та стерилізації композиції А та Б для ферментера об'ємом 100 л;
- для змішування та розчинення солей композиції В для інокулятора об'ємом 10 л та ферментера 100 л.

Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Так як бактерії роду *Lactobacillus* виробляють молочну кислоту потрібні розчини для регуляції рН, а саме 6% розчин HCl для підкислення середовища та стерильний 6% розчин NaOH для стабілізації рН, а також 25% розчин гідроксиду амонію.

РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання

Данні наведені у таблиці 5.1

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика(виробник)
Р-1	Реактор-змішувач для розчинення солей	1	Реактор сталевий об'ємом 10 л, виконаний на замовлення в «Машхим» (Росія); діаметр 0,25 м ; висота 1,175 м ; вага 90 кг; оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм , швидкість премішування від 25 до 3000 об/хв.; потужність двигуна від 0,18 до 1,5 кВт (апарат з плоскою кришкою)[34].
ІН-2	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 10 л. Габаритні розміри: (ширина -465 мм, глибина-465, висота-900 мм),перемішувальний пристрій 100 об/мин [35].
Д-4	Ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор ФС-75. Виробник «ТехноМашСтрой». Мінімальна межа дозування – 1 кг, максимальна – 50 кг. Розміри: 1140 х 730 х 2030мм [36].
Р-6	Реактор-змішувач для розчинення солей	1	Реактор сталевий об'ємом 50 л, оснащений сорочкою та мішалкою. Виробник: «Технолог». Габаритні розміри (ширина -0,65 м, висота- 1,1 м, довжина -0,65м);потужність двигуна 0,37 кВт [37].
Н-7	Насос відцентровий для перекачування розчину солей від Р-6 та Р-1у ферментер Фр-10	1	Насос малої продуктивності Rover romre NOVAX 10 OIL. Продуктивність – 3,5 - 7 л/хв. (35 л за 10 хв), частота обертання 1500 об/хв [38].

НУХТ БТЕК 04.02.33 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Дешко О.		
Керівник		Ключка Л.В.		
Консультант				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання				
		Літ.	Арк.	Акрвішів
			41	
Кафедра БТМ				

Закінчення таблиці 5.1

Фр-8	Ферментер	1	Ферментер Р-100 об'ємом 100 л. Робочий об'єм 70 л. Габарити: Діаметр-580 мм, висота-1757 мм, DN-25. Виробник BIORUS® ,оснащений перемішувальним пристроєммакс. 750 об/мин , датчиком рН [39].
------	-----------	---	---

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ БІОМАСИ

Технологічна схема включає в себе допоміжні роботи такі як підготовка і стерилізація титрувальних розчинів, поживного середовища; та технологічний процес: підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту. Технологічну схему наведено в графічній частині проекту.

ДР 1. Приготування та стерилізація титруючи агентів

Щоб знизити рН середовища до 4,5 для сумісної стерилізації компонентів середовища (солей магнію та фосфору), додають 6%-й розчин HCl з розрахунком 2 мл кислоти на 1 л поживного середовища.

ДР 1.1. Приготування 6%-го розчину хлоридної кислоти.

ДР 1.1. 1. Приготування 6%-го розчину HCl для інокулятора об'ємом 10 л

На даному етапі потрібно приготувати 14 мл 6%-го розчину HCl. Щоб приготувати розчин такої концентрації у колбу об'ємом 50 мл вносять 2,5 мл 6%-го розчину HCl, мірним циліндром відміряють 11,5 мл дистильованої води. Колбу закривають пробкою та перемішують.

ДР 1.1.2. Приготування 6%-го розчину HCl для виробничого ферментера об'ємом 100 л

На даному етапі потрібно приготувати 140 мл 6%-го розчину HCl. Щоб приготувати розчин такої концентрації у колбу об'ємом 500 мл вносять 25 мл 6%-го розчину HCl, мірним циліндром відміряють 115 мл дистильованої води. Колбу закривають пробкою та перемішують.

ДР 1.2. Приготування та стерилізація 6%-го розчину гідроксиду натрію

Щоб довести кислотне середовище до оптимального (рН 6,5), після стерилізації компонентів середовища, додають 6%-й розчин NaOH з розрахунком 2 мл гідроксиду на 1 л поживного середовища.

					НУХТ БТЕК 04.02.33 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу біомаси	Літ.	Арк.	Акрівшів
Розроб.		Дешко О.					43	
Керівник		Ключка Л.В.				Кафедра БТМ		
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ДР 1.2.1. Приготування та стерилізація NaOH для інокулятора об'ємом 10 л

На даному етапі потрібно приготувати 14 мл 6%-го розчину NaOH. Та технічних вагах зважують 0,75 г сухого NaOH, наважку переносять у колбу об'ємом 50 мл, мірним циліндром відміряють 14 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізація проводиться у автоклаві при температурі 131°C протягом 45 хв.

ДР 1.2.3. Приготування та стерилізація NaOH для виробничого ферментера об'ємом 100 л

На даному етапі потрібно приготувати 140 мл 6%-го розчину NaOH. Та технічних вагах зважують 7,5 г сухого NaOH, наважку переносять у колбу об'ємом 500 мл, мірним циліндром відміряють 140 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізація проводиться у автоклаві при температурі 131°C протягом 45 хв.

ДР 2 Приготування та стерилізація допоміжних розчинів

ДР. 2.1 Приготування та стерилізація запасного розчину сульфату феруму.

У колбу об'ємом 250 мл вносять попередньо зважений на технічних вагах 1 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, мірним циліндром відміряють 100 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві при: 131°C, 0,15МПа, 40 хв.

ДР. 2.2 Приготування та стерилізація запасного розчину сульфату мангану.

У колбу об'ємом 250 мл вносять попередньо зважений на технічних вагах 1 г $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, мірним циліндром відміряють 100 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві при: 131°C, 0,15МПа, 40 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу в колбі

Для вирощування інокуляту в колбі необхідно приготувати 0.7 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 0.7 л середовища наведено в табл.6.1

Таблиця 6.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0.7 л середовища для вирощування *L. delbrueckii*

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0.7 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
лактоза	50	35	А	0.5
дріжджовий екстракт	10	7		
вода		500 мл		
пептон	10	7	Б	0.1
вода	-	100 мл		
KH ₂ PO ₄	2	1.75	В	0.1
C ₂ H ₃ NaO ₂ (ацетат натрію)	5	3,5		
вода	-	100 мл		

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 7 г дріжджового екстракту та 35 г лактози. Наважки переносять у колбу об'ємом 1 л та додають 500 мл питної води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізацію термолабільних компонентів середовища проводять в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30 хвилин.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізації композиції Б

На технічних вагах зважують 7 г пептону. Наважки переносять у колбу об'ємом 250 мл та додають 100 мл питної води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 120°C упродовж 30 хвилин.

ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 1.75 г KH_2PO_4 та 3,5 г $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$. Наважки переносять у колбу об'ємом 250 мл та додають 100 мл питної води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 50 хвилин.

ДР 3.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

Для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л необхідно приготувати 7 л поживного середовища. Враховуючи, що для засіву використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 700 мл (10% від загального об'єму середовища), загальну кількість води, яку необхідно додати для приготування поживного середовища становить 6400 мл (табл 6.2).

Таблиця 6.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 7 л середовища для вирощування *L. delbrueckii*

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 7 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
лактоза	50	350	А	1,5
дріжджовий екстракт	10	70		
вода		1,5 л		
пептон	10	70	Б	0,4
вода		0,4 л		
KH_2PO_4	2	14	В	5
$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$	5	35		
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,03	0,21		
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,05	0,35		
вода	-	4,5		
конденсат	-	500		

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 70 г дріжджового екстракту та 350 г лактози. Наважки переносять у колбу об'ємом 3 л та додають 1,5 л питної води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізацію термолабільних

компонентів середовища проводять в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30 хвилин..

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізації композиції Б

На технічних вагах зважують 70 г пептону. Наважки переносять у колбу об'ємом 1 л та додають 400 мл питної води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 120°C упродовж 30 хвилин.

ДР 3.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 14 г KH_2PO_4 , 35 г $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$, 21 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ та 0,35 г $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$. Наважки переносять у збірник об'ємом 10 л, через об'ємно-ваговий дозатор додають 5 л питної води та вмикають мішалку для кращого перемішування компонентів середовища. Отриманий розчин подають у інокулятор об'ємом 10 л, підкислюють до рН 4.5 шляхом додавання через засівну колбу об'ємом 50 мл 6%-й розчин HCl (від ДР 1.1.1) та стерилізують безпосередньо у інокуляторі при температурі 131°C упродовж 45 хв.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживних середовищ для отримання посівного матеріалу в ферментері.

Для вирощування у ферментері об'ємом 100 л необхідно приготувати 70 л поживного середовища. Враховуючи, що для засіву використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 7 л (10% від загального об'єму середовища), загальну кількість води, яку необхідно додати для приготування поживного середовища становить 64 л (табл 6.2).

Вміст компонентів для приготування 70 л середовища наведено в табл. 4.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 70 л середовища для вирощування *L. delbrueckii*

Компонент поживного середовища середовища,	Вміст, г/л	Кількість для приготування 70 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
лактоза	50	3.5 кг	А	50
дріжджовий екстракт	10	700		
вода	-	45 л		
конденсат	-	5 л		
пептон	10	700	Б	10
вода	-	9 л		
конденсат	-	1		
KH_2PO_4	2	140	В	10
$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$	5	350		
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,03	2,1		
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,05	3,4		
вода	-	9 л		
конденсат	-	1 л		

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 700 г дріжджового екстракту та 3,5 кг лактози. Наважки переносять у збірник об'ємом 70 л, через об'ємно-ваговий дозатор подають 45 л питної води. Вмикають мішалку для кращого перемішування. Після розчинення, компоненти стерилізують при температурі 112°C упродовж 30-40 хвилин.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізації композиції Б

На технічних вагах зважують 700 г пептону. Наважку переносять у збірник об'ємом 20 л, через об'ємно-ваговий дозатор подають 9 л питної води. Вмикають мішалку для кращого перемішування. Після розчинення, компоненти стерилізують при температурі 112°C упродовж 30-40 хвилин.

ДР 3.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 140 г KH_2PO_4 , 350 г $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ 21 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ та 35 г $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$. Наважки переносять у збірник об'ємом 20 л, через об'ємно-ваговий дозатор додають 9 л питної води та вмикають мішалку для кращого перемішування компонентів середовища. Отриманий розчин подають у ферментер об'ємом 100 л, підкислюють до рН 4.5 шляхом додавання через засівну колбу об'ємом 250 мл 6%-й розчин HCl (від ДР 1.1.2) та стерилізують безпосередньо у ферментері при температурі 131°C упродовж 45 хв.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Отриману колекційну культуру *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* PTCC1737 зберігають у пробірках на середовищі MRS з 20% гліцерину при -20 ° C. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

ТП 4.2. Одержання робочої культури

Культуру мікроорганізму *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* PTCC1737 готують шляхом перенесення вихідної культури (1 мл) в колбу об'ємом 250 мл, що містить 100 мл середовища MRS, колбу закривають гумовою пробкою та інкубують в анаеростаті при 37 ° C протягом 18 год.

ТП 4.3. Вирощування інокуляту в колбі

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 1 л із 500 мл розчину композиції А (від ДР 3.1.1) в асептичних умовах вносять 100 мл розчину композиції Б (від ДР 3.1.2), 100 мл розчину композиції В (від ДР 3.1.3) та по 1 мл запасного розчину сульфату феруму та манган сульфату в (від ДР 2.1 та ДР 2.2) відповідно. Розчин перемішують .

З колби , яка містить робочу культуру *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* PTCC1737, вирощену на середовищі MRS стерильною піпеткою відбирають 7 мл матеріалу та вносять в колбу з поживним середовищем. Закривають колбу гумовою пробкою. Вирощують посівний матеріал в анаеростаті при 37°C упродовж 24 год. Після завершення вирощування посівний матеріал переносять в стерильну засівну колбу об'ємом 1 л, закривають гумовою пробкою.

ТП 4.4. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

У інокулятор об'ємом 10 л з стерильною композицією В (від ДР 3.2.3), через засівну колбу об'ємом 3 л вносять стерину композицію А (від ДР 3.2.1) та композицію Б (від ДР 3.2.2). В асептичних умовах , через засівну колбу об'ємом 100 мл подають стерильний 6%-й розчин NaOH (від ДР 1.1.2) до рН 6,5. Через засівну колбу об'ємом 1 л переносять посівний матеріал (від ТП 4.3.). Вирощування культури в інокуляторі відбувається до накопичення біомаси (2,5 г/л) без подачі аераційного повітря оскільки даний штам є анаеробом. Тривалість культивування становить 24 години, температура (37°C) та рН 6,5.

ТП 5. Виробничий біосинтез

ТП 5.1. Виробничий біосинтез біомаси

У ферментер р об'ємом 100 л з стерильною композицією В (від ДР 3.3.3), подають стерину композицію А (від ДР 3.3.1) та композицію Б (від ДР 3.3.2). В асептичних умовах, через засівну колбу об'ємом 500 мл подають стерильний 6%-й розчин NaOH (від ДР 1.1.3) до рН 6,5. Через трубу перетискування подають посівний матеріал (від ТП 4.4.). Вирощування культури в ферментері відбувається до накопичення біомаси 5,1 г/л без подачі аераційного повітря оскільки даний штам є анаеробом. Тривалість культивування становить 52 години, температура (37°C) та рН 6,5. Культивування припиняється при 37 °C та рН 6,5.

РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва

Зважаючи на те, що культивування *Lactobacillus delbrueckii*з метою одержання біомаси проводиться в асептичних умовах, необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах, для того щоб впевнитись у відсутності контамінації.

Контроль на відсутність сторонніх мікроорганізмів проводять:

1. Методом мікроскопії - шляхом перегляду мазків, приготованих із зависі розчиненого препарату та пофарбованих по Граму. В мазках повинні бути позитивні поліморфні палички з можливою біфуркацією на одному або двох кінцях, щорозміняться у вигляді скупчень або окремих клітин.

2. Мікробіологічним методом – шляхом посіву на м'ясопептонний агар, м'ясопептонний агар з 5% глюкозою та агаризоване середовище Сабуро. Висівають по 0,5 культуральної рідини мл у пробірки (по 2 пробірки з поживним середовищем).

Методика визначення кількості живих лактобактерій. Визначення числа життєздатних лактобактерій, проводили методом послідовних десятикратних розведень. 1 мл дослідного зразка розчиняли в 9 мл стерильного ФР(фізіологічний розчин) і перемішували до повного розчинення. З першого розведення у ФР готували ряд 10-кратних серійних розведень від 10^{-2} до 10^{-9} . З кожного отриманого розведення по 1 мл вносили у дві паралельні пробірки з високими стовпчиками (9,0 мл) напіврідкого середовища (MRS), щоб отримати достатню кількість колоній для підрахунку. Пробірки інкубували в термостаті при (37 ± 1) °С. Облік результатів здійснювали через 48 годин шляхом підрахунку кількості типових для лактобактерій колоній у пробірках з найбільшим розведенням, у яких спостерігався ріст у пробірках, що передують найбільшому розведенню[40].

					НУХТ БТЕК 04.02.33 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Дешко О.					51	
Керівник		Ключка Л.В.						
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ			

Визначення сухої маси.

Суха маса клітин визначається за допомогою спектрофотометра (Shimadzu, 1601, Японія) при довжині хвилі 480нм[41].

7.2.1.Визначення концентрації біомаси.

Концентрацію біомаси визначають за допомогою датчику визначення оптичної густини BE-2700. Безконтактний онлайн датчик, що кріпиться до зовнішньої стінки ферментеру (смотрового люку). У датчику BE2100 використовуються інфрачервоні лазери і детектори. Кожна пара лазер-детектор в матриці чутлива до різних діапазонах зміни концентрації біомаси. Має графічний і цифровий дисплей даних з ототобренням в режимі реального часу. За допомогою програмного забезпечення можна калібрувати датчик в будь-яких можливих одиницях (г/л, од./мл)

Визначення активності кислотоутворення клітин.

Активність кислотоутворення клітин визначають титриметричним методом. По 10мл культури вносять у дві хімічні склянки місткістю 50мл і титрують 0,1М розчином натрію до рН (8,5±0,5). Показник рН контролюють потенціометрично. Кислотність у градусах Тернера визначають за формулою: $^{\circ}T = VK \times 10,67$ Де V - об'єм 0,1 М гідроксиду натрію, використаний на титрування, мм; K – коефіцієнт поправки до титру 0,1 М розчину гідроксиду натрію. Середнє значення активності кислотоутворення, отримане для двох зразків, має бути не нижче ніж 90°Т. У разі отримання в одному із зразків показників кислотності нижче ніж 90°Т дослід повторюють[42].

Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом вуглецю в середовищі для культивування *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* PTCC1737 є лактоза.

Визначення концентрації лактози йодометричним методом.

Принцип методу ґрунтується на взаємодії альдегідної групи лактози з йодом у лужному середовищі, де йод є окисником. Атомарний кисень, що виділяється при цьому, окиснює лактозу в лактобіонову кислоту(глюкозу – в глюконову кислоту), яка в лужному середовищі утворює сіль.

Лабораторний посуд, апаратура, матеріали та реактиви:

аналітичні терези, годинник, мірні колби місткістю 250 мл, конічні колби місткістю 250 мл, хімічні склянки місткістю 100 мл, лійки для фільтрування, піпетки, бюретки для титрування, розчин купрум сульфату, 0,1 н розчин натрій тіосульфату, 0,1 н розчин йоду, 0,1 н розчин натрій гідроксиду, 1,0 %-й розчин крохмалю, 0,5 н розчин хлоридної кислоти, 1,0 н розчин натрій гідроксиду, гумові пробки, молоко, фільтрувальний папір.

Хід роботи. Зважують з точністю до 0,01 г 10 мл молока і переносять у мірну колбу місткістю 250 мл, обмивають склянку, в якій зважувалось молоко, дистильованою водою і переливають суміш у мірну колбу. Доливають у мірну колбу воду до половини місткості і перемішують. Для осадження білків і жирів додають 10 мл розчину купрум сульфату і 4 мл 1 н розчину натрій гідроксиду, перемішуючи рідину після вливання кожного реактиву. Доливають до позначки водою, знову перемішують і залишають відстоюватись протягом 30 хв. Відстояну рідину фільтрують у суху колбу через складчастий фільтр невраховуючи перші 10 – 20 мл фільтрату.

Переносять 25 мл фільтрату, що відповідає 1 г молока, в конічну колбу місткістю 250 – 300 мл, в іншу таку саму колбу вносять 25 мл дистильованої води (контрольний дослід). В обидві колби додають по 25 мл 0,1 н розчину йоду і одразу при постійному перемішуванні повільно приливають з бюретки

по 37,5 мл 0,1 н розчину натрій гідроксиду. Колби закривають гумовими пробками і витримують протягом 20 хв у темному місці при температурі 20°C. Потім у кожен колбу вливають по 8 мл 0,5 н розчину хлоридної кислоти і титрують, йод, що виділився розчином натрій тіосульфату в присутності індикатора (1,0 %-й розчин крохмалю)

Титрування проводять спочатку повільно без індикатора до появи світложовтого забарвлення розчину, потім доливають 1 мл індикатору і продовжують титрувати до моменту, коли від однієї краплини розчину натрій тіосульфату сине забарвлення зникає.

Вміст лактози, %, обчислюють за формулою:

$$L = \frac{0,01801 \times (A - B) \times 0,97}{n} \times 100\%,$$

де 0,01801 – кількість лактози, еквівалентна 1 мл 0,1 н розчину йоду, г; А і В – кількість 0,1 н розчину натрій тіосульфату, витраченого на титрування йоду у відповідно контрольній і дослідній пробах, мл; 0,97 – поправка, встановлена емпірично; n – наважка молока, г; 100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки.

Визначення концентрації джерела Азоту

Основним джерелом азоту в даному середовищі є пептон.

Його визначають концентрацією азоту реактивом Неслера.

Принцип методу заснований на властивості реактиву Неслера давати кольорову реакцію з іонами амонію, що утворюються після мінералізації азотовмісних органічних речовин.

Реактиви: сірчана кислота концентрована, водню перекис – пергідроль (29–35%), реактив Неслера (готовий), розчин амонію сірчанокислового, що містить 0,05 мг/мл азоту.

Метод: На піщаній бані мінералізують 1 мл культуральної рідини (2 паралельні проби) з 0,1 мл концентрованої сірчаної кислоти в пробірках зі скляними ковпачками. Паралельно мінералізують контрольну пробу, яка містить 0,1 мл концентрованої сірчаної кислоти. Для прискорення мінералізації в охолоджені випробовувані і контрольні проби періодично додають по 1–2 краплі пергідролю. Спалювання продовжують до знебарвлення вмісту пробірок. До отриманих мінераліватів додають по 8,9 мл дистильованої води, попередньо обмивши ковпачок, ретельно перемішують розчини. На колориметрування відбирають по 1 мл розчину мінералізату, додають 8,5 мл дистильованої води, перемішують, а потім – по 0,5 мл реактиву Неслера. Проби перемішують і колориметрують на фотоелектроколориметр з синім світлофільтром (з довжиною хвилі 400 нм) в кюветах, з товщиною шару 10 мм.

Розчином порівняння служить розчин, приготований аналогічно зразку.

Вміст загального азоту в препараті у відсотках (X) обчислюють за формулою:

$$X = (B \times 10 \times 100 \times 100) / 1,0 \times 1,0 \times 1000000 = B/10$$

де B – кількість азоту, мкг, знайдена за калібрувальним графіком; 10 – розведення мінералізату; 100 – ступінь розведення рідкого гідролізату; 100 – коефіцієнт перерахунку, %; 1,0 – кількість препарату, мл, взятого для колориметрування; 1,0 – кількість досліджуваного зразка, мл, взятого для мінералізації; 1000000 – коефіцієнт перерахунку, г[43].

Таблиця 7.1

Таблиця 5.1

Карта постадійного контролю

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Кх 1.1. Приготування 6% розчину HCl	Розчин HCl концентрація	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	C=6%
Кт, Кх, Км 2.1. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH	Розчин гідроксиду натрію Тиск, час, концентрація, відсутність мікробіоти	Хімічний метод Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль проводиться після стерилізації	T=131 °C, t=40 хв, P=0,15 МПа, C=6%, відсутність мікробіоти
Кх 3.1. Підготовка 25% розчину аміачної води	Розчин аміачної води концентрація	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	C=25%

Кт,Кх,Км 2.1., 2.2 Приготування та стерилізація допоміжних розчинів	Розчин мікроелементів Тиск, час, концентрація, відсутність мікробіоти	годинник, манометр, мікробіологічний контроль	тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль проводиться після стерилізації	T=131 °C, t=40 хв, P=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбі Кт, Км 3.1.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А час, тиск, відсутність мікробіоти	годинник, манометр, мікробіологічний контроль	тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль проводиться після стерилізації	T=112 °C, t=30 хв, P=0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б час, тиск, відсутність мікробіоти	годинник, манометр, мікробіологічний контроль	тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль проводиться після стерилізації	T=120 °C, t=40 хв, P=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В час, тиск, відсутність мікробіоти	годинник, манометр, мікробіологічний контроль	тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль проводиться після стерилізації	T=131 °C, t=40 хв, P=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л Кт, Км 3.2.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А час, тиск, відсутність мікробіоти	годинник, мікробіологічний контроль	тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль проводиться після стерилізації	T=112 °C, t=30 хв, P=0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б час, тиск, відсутність мікробіоти	годинник, мікробіологічний контроль	тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль проводиться після	T=120 °C, t=40 хв, P=0,15 МПа, відсутність мікробіоти

Кт, Км 3.2.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В час, тиск, відсутність мікробіоти	годинник, манометр, мікробіологічний контроль	стерилізації тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль проводиться після стерилізації	T=131 °C, t=40 хв, P=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування У ферментері об'ємом 100 л Кт, Км 3.3.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А час, тиск, відсутність мікробіоти	годинник, мікробіологічний контроль	тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль проводиться після стерилізації	T=112 °C, t=30 хв, P=0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б час, тиск, відсутність мікробіоти	годинник, мікробіологічний контроль	тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль проводиться після стерилізації	T=120 °C, t=40 хв, P=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В час, тиск, відсутність мікробіоти	годинник, манометр, мікробіологічний контроль	тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль проводиться після стерилізації	T=131 °C, t=40 хв, P=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Підготовка посівного матеріалу Кт, Км 4.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus PTCC1737 Температура, час, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 1-2 місяці	T=- 20 °C, t=3-4 місяці, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2 Одержання робочої культури на середовищі MRS	Колекційна культура <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus PTCC1737 Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 2-4 годин	T=37 °C, t=18 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км ,Кх 4.3 Вирощування посівного матеріалу в колбі	Колекційна культура <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus PTCC1737	Термометр, годинник, мікроскоп	Мікробіологічний контроль проводять кожні 2-4 годин	T=37 °C, t=18 год, відсутність сторонньої мікробіоти

	Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури, морфологічна однорідність			
Кт,Км,Кх, 4.4 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л	Посівний матеріал <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> PTCC1737 Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічний контроль	Годинник, тахометр, мікроскоп, термометр	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікроскопіювання – кожні 2-4 годин	t = 37 °С, Т= 18 год, рН=6-6,5, рівень біомаси 12,0 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Виробничий біосинтез Кт,Км,Кх, 5.1 Виробничий біосинтез в ферментері об'ємом 100 л	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> PTCC1737 Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічний контроль	Годинник, тахометр, мікроскоп, термометр	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікроскопіювання – кожні 2-4 годин	t = 37 °С, Т= 24 год, рН=6-6,5, рівень біомаси 16,02 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Береговая Т.В. Применение пробиотиков в клинической практике: горизонты расширяются. *Здоров'я України*. 2008, 4(185):52-57.
2. Артюхова С.И., Жидкова О.Н. Влияние пробиотических продуктов на здоровье человека: автореф. диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук- Улан-Удэ,2004.- С. 18–21.
3. Балаклієць Н.І.,Циганенко А.Я., Мінухін В.В. Загальна мікробіологія. Навч. Посібник — Харків: ХНМУ, 2002. – 258с .
4. Chou K.M. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods.*J. Onio*, 1995, 17: 25–34.
- 5.Clark P.A., Martin J.H. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods.*III- Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines Cult.* 1994, 5: 4852.
6. Калініченко. С.В., БабичЄ.М., РижковаТ.А., МаслійІ.Г. Вивченнябіологічнихвластивостейпробіотичнихштамів*Lactobacillus* SPP. прикультивуванніїхваеробнихтамікроаерофільнихумовах:*АнналиМечниковського оінституту*. 2014, 1:33-37.
7. Pyar H., Liong Min-Tze, Peh K.K. Potentials of pineapple waste as growth medium for *Lactobacillus* species. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014, 6(1): 142-145
8. Anukam K.C., Osazuwa E.O., Ahonkhai I., Reid G. 16S rRNA gene sequence and phylogenetic tree of *Lactobacillus* species from the healthy Nigerian women. *Afr J Biotechnol*. 2005;4:1222–27.
9. Bevillard E., Burton J.P., Hammond J.A., Lam D., Reid G. Novel insight into the urogenital microflora in postmenopausal women under hormone replacement therapy as analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Eur J Obstet Gynecol Reproductive Biol*. 2014;117:76–81

10. Habibi A., Khameneie M.K. Antibiotic resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pregnant women with history of recurrent urinary tract infections. *Trop J Pharm Res.* 2016;15(8): 1745–50. doi: 10.4314/tjpr.
11. Hanson L., VandeVusse L, Jerm'e M., Abad C. L., Safdar N. Probiotics for Treatment and Prevention of Urogenital Infections in Women: A Systematic Review. *J. Midwifery & Women's Health.* 2016, 61(3): 339-355. doi:10.1111/jmwh.12472
12. Parish A., Holliday K. Long-term care acquired urinary tract infections' antibiotic resistance patterns and empiric therapy: a pilot study. *Geriatr Nurs.* 2012;33(6): 473–8. doi: 10.1016/j.gerinurse.2012.05.003.
13. Matulay J.T., Mlynarczyk C.M., Cooper K.L. Curr Bladder Dysfunct Rep. 2016;11(1): 53–60. doi:10.1007/s11884-016-0351-x.
14. Rossoni, R. D., Velloso, M. dos S., de Barros, P. P., de Alvarenga, J. A., Santos, J. D. dos, Santos Prado, A. C. C. dos, Junqueira, J. C. Inhibitory effect of probiotic *Lactobacillus* supernatants from the oral cavity on *Streptococcus mutans* biofilms. *Microbial Pathogenesis.* 2018, 123:361–367. doi:10.1016/j.micpath.2018.07.032
15. Лактіале® Уро. Електронний ресурс. Режим доступу: https://laktiale.ua/ua/laktiale/laktiale_uro/
16. Rezvani F., Ardestani F., Najafpour G. Growth kinetic models of five species of *Lactobacilli* and lactose consumption in batch submerged culture. *J. Brazil. Microbiol.* 2017.
18. Chin-Fa H., Chien-Ku L., Shin-Yi Y., Ren-Han C., & Hau-Yang T. Enhancement of biomass production and nutrition utilization by strain *Lactobacillus acidophilus* DGK derived from serial subculturing in an aerobic environment. *African J. Biotechnol.* 2015; 14(3), 248–256.
19. Freitas R.M., Carvalho J.D.G., Bruno L.M. Pinto G.A.S. Production de *Lactobacillus rhamnosus* BRM 029693 in feed-batch fermentations. *Research, Society and Development.* 2020; 4(17):24-57.
20. van de Wijkert J.H.H.M., Borgdorff H., Verhelst R., Crucitti T. Francis S., Verstraelen H, et al. The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? *PLoS One.* 2014;9:45-52.

21. van de Wijgert J.H.H.M., Jespers V. The global health impact of vaginal dysbiosis. *Res Microbiol.* 2017;168:859–64.
22. Tachedjian G., Aldunate M., Bradshaw C.S., Cone R.A. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. *Res Microbiol* 2017;168:782–92.
23. Muzny C.A., Schwebke J.R. Biofilms: an underappreciated mechanism of treatment failure and recurrence in vaginal infections. *Clin Infect Dis* 2015;61:601–6.
24. van de Wijgert J.H.H.M. The vaginal microbiome and sexually transmitted infections are interlinked: consequences for treatment and prevention. *PLoS Med* 2017;14:27-35.
25. O’Toole P.W., Marchesi J.R., Hill C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol* 2017; 2:17057. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.57.
26. Bradshaw C.S., Brotman R.M. Making inroads into improving treatment of bacterial vaginosis-striving for long-term cure. *BMC Infect Dis* 2015; 15:292. doi: 10.1186/s12879-015-1027-4.
27. Petrova M.I., Imholz N.C.E., Verhoeven T.L.A., Balzarini J., Van Damme J.M, Schols D., et al. Lectin-like molecules of *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibit pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella biofilm* formation. *PLoS One* 2016; 18;11(8):e0161337. doi: 10.1371/journal.pone.0161337.
28. Allonsius C.N., Vandenheuvel D., Oerlemans E.F.M., Petrova M.I., Donders G.G.G., Cos P., et al. Inhibition of *Candida albicans* morphogenesis by chitinase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Sci Rep* 2019;9:2900.
29. van de Wijgert J.H.H.M., Verwijns M.C., Agaba S.K., Bronowski C., Mwambarangwe L., Uwineza M., et al. Intermittent lactobacillicontaining vaginal probiotic or oral metronidazole use to prevent bacterial vaginosis recurrence: safety and preliminary efficacy by microscopy and sequencing. *MedRxiv* 2019. <https://doi.org/10.1101/19001156>

30. Moher D., Liberati A., Tetzlaff J., Altman D.G., Group T.P.. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med* 2009;6(2): 425-429.

31. Стоматологічне здоров'я населення громади: проблеми та можливості покращення (на прикладі Івано-Франківської області) Дмитренко І.А., Толстанов О.К.
<https://www.umj.com.ua/article/186891/stomatologichne-zdorov-ya-naselennya-gromadi-problemi-ta-mozhливosti-pokrashhennya-na-prikladi-ivano-frankivskoyi-oblasti>

32. Чисельність населення (за оцінкою) на 1 вересня 2018 року.//Інтернет ресурс [Режим доступу]: http://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2018/ds/kn/kn_u/kn0818_u.html

33. Rezvani F., Ardestani F., Najafpour G. Growth kinetic models of five species of *Lactobacilli* and lactose consumption in batch submerged culture. *J. Brazil. Microbiol.* 2017.

34. Реактор стальний об'ємом 10 л виконаний на замовлення в «Машхим» (Росія). [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://mash-him.ru/apparaty-s-peremeshivayushhimi-ustrojstvami>

35. Інокулятор об'ємом 10 л, виконаний на замовлення в «Labfors» [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.diam.ru/catalog/lab/bioreactory-bakterialnye-fermentery/infors-labfors_5_b-fermenter-labfors-5-bakterialnyj-20-36-75-13-l/

36. Ваговий дозатор ФС-75. Виробник «ТехноМашСтрой». [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://mashgroup.ck.ua/ua/p1254852486-vesovoj-doзатор.html>

37. Реактор стальний об'ємом 50 л. Виробник: «Технолог». [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://tehnolog.com.ua/catalog/pharma/mixers-for-liquid-viscous-and-paste-like-products/>

38. Насос малої продуктивності RoverpompeNOVAX 10 OIL . [Електронний ресурс] Режим доступу:<https://mashinform.ru/nasosy/nasosy-dlia-vody/rover-pompe-novax-10-oil-obj8199.html>
39. Ферментер об'ємом 100 л.[Електронний ресурс] Режим доступу:<https://termopab.com.ua/p1097166722-tskt-100-litrov.html>
40. Growth kinetic models of five species of *Lactobacilli* and lactose consumption in batch submerged culture Електронний ресурс//режим доступу//
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5470453/>
41. Йодометричний метод визначення лактози [Електронний ресурс]//Режим доступу:<https://studfile.net/preview/5194731/page:2/>
42. Визначення концентрації органічного азоту методом Несслера[Електронний ресурс]//Режим доступу:<https://studfile.net/preview/12538458/page:5/>