МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Факультет біотехнології та екологічного контролю .
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»
Директор інституту (декан факультету)
_____ Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)
«___» _____ 2020 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
_____ Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)
«___» _____ 2020 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» .
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми Біотехнології:фармацевтична,промислова, харчова,природоохоронна»
на тему: Одержання біомаси *Bifidobacterium bifidum* для виробництва Біфідобактерину форте

Виконав: здобувач IV курсу, групи 3
Марищук Аріна Геннадіївна _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Тетеріна Світлана Миколаївна _____
(прізвище , ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти Клименко О.М. _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Остапенко С.І. _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.
Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

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

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

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

_____ Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

З А В Д А Н Н Я
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Марищук Аріни Геннадіївни
(прізвище, ім'я, по батькові)

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

керівник роботи доцент , кандидат тенічних наук Тетеріна Світлана Миколаїва
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент :*Bifidobacterium bifidum* цільовий продукт:пробіоти Біфідумбактерин форте

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового про продукту . РОЗДІЛ 2. Обгрунтування вибору та характеристика біологічного агента . РОЗДІЛ 3. Техніко–економічне обґрунтування . РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту . РОЗДІЛ 5 Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва . РОЗДІЛ 6 Матеріальний баланс, розрахунок обладнання . РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання . РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми . РОЗДІЛ 9 Контроль виробництва . РОЗДІЛ 10 Автоматизація ділянки виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва пробіотику – 2 аркуші (формат А1)

Апаратурна схема виробництва пробіотику – 2 аркуші (формата А1)

Схема автоматизації ділянки виробництва – 1 аркуш (формат А2)

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
	Клименко Олег миколайович Доцент,к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій системи управління	11.05.20	17.05.20

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового про продукту	6.03.20-9.03.20	
2	Обгрунтування вибору та характеристика біологічного агента	10.03.20-14.03.20	
3	Техніко–економічне обґрунтування	15.03.20-20.03.20	
4	Біосинтез цільового продукту	17.03.20-19.03.20	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва	21.03.20-30.03.20	
6	Матеріальний баланс, розрахунок обладнання	30.03.20-5.04.20	
7	Специфікація обладнання	6.04.20-15.04.20	
8	Опис технологічної схеми	10.04.20-20.04.20	
9	Контроль виробництва	21.04.20-10.05.20	
10	Автоматизація ділянки виробництва	11.05.20-17.05.20	
11	Оформлення пояснювальної записки	17.05.20-18.05.20	
12	Виконання графічної частини проекту	19.05.20-21.05.20	

Здобувач _____ Маришук А.Г
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____ Тетеріна С.М
(підпис) (прізвище та ініціали

РЕФЕРАТ

Дипломний проект включає розділи: « обгрунтування вибору біологічного агента, «техніко-економічне обгрунтування(ТЕО)», «обгрунтування вибору технологічної схеми», «продуктовий розрахунок та матеріальний баланс», «специфікація обладнання», «контроль виробництва» «автоматизація ділянки виробництва», «обгрунтування вибору технологічної схеми», «особливості біосинтезу цільового продукту».

За ТЕО розрахована річна потреба у цільовому продукті, яка становить 43 кг/рік ,біомаси пробіотичного штаму *Bifidobacterium bifidum* 1. Біосинтез біомаси здійснюється у ферментері місткістю 100 л тривалістю 24 години. Розроблену технологію виділення і очишення цільовогопродукту у вигляді буомаси пробіотичного організму *Bifidobacterium bifidum*1 , що включає стадію відділення біомаси за допоиогою фільтрувальної центрифуги, стадію змішування біомаси з захисним середовищем, на основі молока знежиреного та сорбітолу, стадію ліофільного висушування у ліофілізаторі та стадію пакування у первинну упаковку.

Виробництво для покриття потреби триває 233 днів, кількість виробничих циклів за весь період виробництва становить 233 цикли. За розрахунковим даними підібране обладнання , обгрунтована та складена технологія виділення і очищення а також виготовлення кінцевого продукту, що представлена у вигляді апаратурної та технологічної схем.

Дипломний проект складається з 10 розділів, висновків, 80 джерел використаної літератури та графічної частини, що включає 2 креслення формату А1 та технологічну схему розміщену на А1 Загальний обсяг роботи – 144 сторінки, 27 таблиць, 12 рисунків.

Ключові слова:. Пробіотик, Біфідумбактерин, антагонізм.

Зміст

ВСТУП **7**

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту 9

РОЗДІЛ 2. Обгрунтування вибору та характеристика біологічного агента 14

2.1 Обгрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування 14

2.2 Розрахунок складу поживного середовища. 23

2.3 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента 25

2.4.Таксономічний статус біологічного агента 27

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обгрунтування 29

3.1 Потреба у цільового продукті 29

3.2 Розрахунок потужності виробництва 36

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

3.4 розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу. 38

РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту 40

4.1 Шляхи катаболізму ростового субстрату у *Bifidobacterium bifidum* 1 40

4.2 Біосинтез біомаси *Bifidobacterium bifidum* 1 42

РОЗДІЛ 5. Обгрунтування вибору технологічної схеми 48

5.1 Обгрунтування доферметаційних процесів та виробничого біосинтезу. 48

5.2 Обгрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту. 60

РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання 69

6.2 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу біомаси штам *Bifidobacterium bifidum* 1 71

6.3. Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу. 72

6.4 Матеріальний баланс на один цикл виробництва(партію). 78

6.5. Розрахунок технологічного обладнання. 81

РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання 85

РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми 88

РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва 101

9.1 Карта постадійного контролю 101

9.2 Мікробіологічний контроль. 111

Розділ 10. Автоматизація виробництва..... 120
10.1 Поставлення завдання на розробку системи автоматизації реактора. 120
Висновок..... 126
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ..... 127
Додаток..... 134

ВСТУП

В наш час структура харчування у розвинених країнах характеризується незбалансованістю за складом нутрієнтів, вітамінів, мікроелементів, харчових волокон, підвищеним вмістом антибактеріальних компонентів, консервантів, стабілізаторів, гормонів, нерегулярністю, різкими змінами раціонів і режимів харчування [1] . Однак очевидно, що найістотніший внесок у парадигму сучасної захворюваності привнесло широке використання антибактеріальних засобів. З моменту відкриття антибіотиків неухильно зростає їхнє споживання у всіх країнах. На світовому ринку нині річна вартість виготовлення антибіотиків перевищує 10 млрд доларів США. Загалом антибіотики відіграли свою, безсумнівно, позитивну роль у боротьбі з інфекційними захворюваннями. Але незабаром стало зрозуміло, що у них є побічні ефекти. [1,2]

Найбільш вираженим з урахуванням поширеності наслідком антибіотикотерапії вважають дисбактеріоз кишечника. Навіть короткочасний щоденний контакт з антимікробними препаратами призводить до зміни кишкового мікробіоценозу, що часто можна спостерігати, наприклад, у працівників фармацевтичних виробництв. Важливо й те, що паралельно зі зростанням споживання антибіотиків зростає захворюваність нозологічними формами, що вважалися рідкісними, казуїстичними в доантибіотиковий період[2]

Основним засобом профілактики і лікування захворювань шлунковокишкового тракту, викликаних дисбактеріозом, є препарати, що належать до групи пробіотиків, використання яких дозволяє покращити, а інколи й відновити стан мікрофлори кишечника та слизових оболонок організму людини, що приводить до загального покращання стану здоров’я та попереджає розвиток цілої низки хронічних захворювань.[3]

У комплексній терапії провідну роль відіграють пробіотичні препарати, ефективність яких залежить від біологічних властивостей бактерій виробничих штамів, що входять до їх складу.

Пробіотики – живі мікроорганізми, які можуть позитивно впливати на здоров'я людини, нормалізувати склад і функції мікрофлори шлунково-кишкового тракту (ШКТ).

Найбільш важливими симбіонтами шлунково-кишкового тракту людини є біфідобактерії та лактобацили. За сучасними даними, рід Bifidobacterium *1* включає 32 види .

Біфідобактерії мають морфокінетичні властивості, продукують біологічно активні сполуки, зокрема, вітаміни групи В, виконують імуногенну й антимутагенну функції, а також беруть участь у детоксикації екзо- та ендогенних токсичних агентів. Антагоністична активність біфідобактерій пов'язана з продукцією органічних кислот (ацетату і лактату), бактерицидна – з широким спектром антимікробної дії (інгібування росту кишкових паличок, клостридій, сальмонел, шигел, лістерій, вібріонів та ін.) і блокуванням рецепторів на слизовій кишечника, що запобігає фіксації на ній потенційно патогенних мікроорганізмів. Усі ці позитивні ефекти дали змогу розглядати біфідобактерії як одну з основних складових функціонального харчування [1,3]

Актуальність . З огляду на розглянуті літературні дані щодо медичного застосування пробіотичних препаратів на основі біфідобактерій, актуальним в сучасних умовах є випуск таких препаратів з використанням штамів біфідобактерій, з вираженими антагоністичними властивостями іммобілізовані на сорбенті. Тобто таких препаратів, як Біфідумбактерин форте.

Новизна . Використання для культивування *Bifidobacterium* 1 на поживному середовищі з внесенням в якості стимулятора росту соєвої сироватки у кількості 3% та застосування оптимальних умов культивування для даної технології, що дозволяє синтезувати 10^9 КУО $^{г}/_{л}$, порівняно з 10^6 КУО $^{г}/_{л}$ [4] у разі використання класичних стимуляторів росту.

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

Основним цільовим продуктом є пробіотична біомаса *Bifidobacterium bifidum* 1. Основні її властивості такі, ж як і у біомаси з якої виготовляється препарат «Біфідумбактерин форте». Тому для опису властивостей цільового продукту наводимо основні характеристеки препарату.

Загальна характеристика

Основні властивості лікарської форми: порошок жовтого, білого або сірого кольору, кисломолочного запаху і смаку. При розчиненні у воді утворює непрозору суспензію.

Діюча речовина: ліофілізат живих біфідобактерій не менш $1*10^8$ КУО в одній дозі.

Допоміжні речовини: цукроза, желатин, молоко сухе.

Форма випуску. Порошок.

Біологічні властивості

Терапевтичний ефект Біфідумбактерину визначають живі біфідобактерії, які мають антагоністичну активність проти широкого спектра патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів. Перевага біфідофлори в мікробіоценозі після застосування препарату нормалізує діяльність шлунково-кишкового тракту, поліпшує обмінні процеси, стимулює функціональну діяльність травної системи, попереджає розвиток затяжних форм кишкових захворювань, підвищує неспецифічну резистентність організму.

Показання до застосування

Біфідумбактерин застосовують для лікування дорослих і дітей з перших днів життя. Можна застосовувати при вагітності й лактації.

Показання препарату Бифидумбактерин Форте

В якості монотерапії або в складі комплексної терапії:

- дисбактеріоз кишечника;
- гострі кишкові інфекції встановленої (шигельоз, сальмонельоз, стафілококовий ентероколіт, ротавірусна інфекція) і невстановленої етіології;
- харчові токсикоінфекції;
- ГРВІ;
- хронічні захворювання з ураженням шлунково-кишкового тракту (виразкова хвороба шлунка та дванадцятипалої кишки, панкреатит, холецистит, захворювання печінки і жовчовивідних шляхів), що супроводжуються дисбактеріозом кишечника;
- хронічні запори;
- синдром мальабсорбції;
- алергічні захворювання, що супроводжуються дисбактеріозом кишечника;
- пневмонія, гострі та хронічні бронхіти, запальні захворювання урогенітального тракту, що супроводжуються дисбактеріозом кишечника;
- дисбактеріоз кишечника, викликаний прийомом антибіотиків, антибактеріальних препаратів, гормонів, НПЗЗ;
- діарея у пацієнтів, які отримували тривале лікування антибіотиками і іншими антибактеріальними препаратами;
- корекція мікробіоценозу кишечника і профілактика гнійно-запальних захворювань у хворих хірургічного профілю в період передопераційної підготовки і після операцій на кишечнику, печінці, підшлунковій залозі.

Режим дозування

- Препарат застосовують внутрішньо під час прийому їжі, при необхідності - незалежно від прийому їжі.
- Препарат у формі порошку для прийому всередину призначають дорослим і дітям всіх вікових груп. Порошок перед вживанням змішують з рідкою їжею, переважно з кисломолочним продуктом, для новонароджених та

грудних дітей - з материнським молоком або сумішшю для штучного вигодовування. Порошок можна змішати з 30-50 мл кип'яченої води кімнатної температури, при цьому утворюється каламутна суспензія . Отриману водну суспензію слід випити, не добився повного розчинення.

- Залежно від тяжкості захворювань Бифидумбактерин форте застосовують в звичайних або збільшених дозах.
- *З метою лікування* препарат в звичайних дозах призначають пацієнтам всіх вікових груп.
- Звичайна доза для дорослих по 1 пакетику 2 рази / добу; для дітей у віці 1 року і старше - по 1 пакетику 2-3 рази / добу, у віці до 1 року - по 1 пакетику 2-3 рази / сут.
- Курс лікування *при гострих кишкових інфекціях і харчових токсикоинфекціях*становить 5-7 днів, *при інших захворюваннях* - 15-28 денів, в залежності від характеру і тяжкості захворювання. При необхідності курси лікування можна повторити 2-3 рази, кожен курс проводиться через місяць після закінчення попереднього курсу лікування.
- *При хірургічній патології* препарат застосовують протягом 3-5 днів *до операції* і протягом 10-15 днів *після операції:* дорослим призначають по 2 пакетика 3 рази / добу; дітям у віці 3 років і старше - по 1 пакетику 3-4 рази / добу, у віці до 1 року - по 1 пакетику 3 рази / добу.
- *З метою лікування* препарат в збільшених дозах призначають дорослим і дітям у віці 1 року і старше.

Побічна дія

При застосуванні за показаннями у рекомендованих дозах побічна дія препарату не встановлено.

Протипоказання до застосування

- індивідуальна непереносимість препарату.

Застосування при вагітності та годуванні груддю

Препарат дозволений для застосування при вагітності та в період лактації (грудного вигодовування).

Застосування у дітей
Препарат застосовують у дітей .

Особливі вказівки
З обережністю слід застосовувати препарат при лактазной недостатності.

Передозування
Передозування препарату Бифидумбактерин форте неможлива в зв'язку з відсутністю кумулятивного дії.

Лікарська взаємодія
При одночасному прийомі з вітамінами (особливо групи В) дію препарату посилюється.

Умови зберігання препарату Бифидумбактерин Форте
Пакети слід зберігати при температурі не вище 10 ° С. Нижня межа температури не лімітується. Транспортування здійснюється при температурі не вище 10 ° С;допускається транспортування при температурі до 20 ° С не більше 10 діб. Капсули слід зберігати при температурі від 2 ° до 10 ° С.

Термін придатності препарату
Термін придатності - 1 рік.

Препарат слід зберігати в недоступному для дітей місці.

Умови реалізації
Препарат дозволений до застосування в якості засобу безрецептурного відпуску [5].

Рис 1.1 Біфідобактерин форте

РОЗДІЛ 2. Обгрунтування вибору та характеристика біологічного агента

2.1 Обгрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

В даний час препарати з пробіотичною функцією широко застосовуються для корекції порушеної нормальної мікрофлори людини. Нормальна мікрофлора розглядається як якісне і кількісне співвідношення популяцій мікробів окремих органів і систем, що підтримують біохімічну, метаболічну і імунологічну рівновагу організму господаря .

Близько 1000 різних видів бактерій можуть бути знайдені в кишечнику людини. Насправді людина містить більше бактеріальних клітин, що становлять 90 %, ніж людських – 10 % [1, 2].

Термін «пробіотик» широко використовується уже 50 років. Його визначення уточнювалось у ході накопичення експериментальних даних. Упродовж років існувало кілька трактувань терміна «пробіотик», нині широко використовують

Визначення терміна «пробіотики», запропоноване російським вченим Б.А.Шендеровим: пробіотики – це живі мікроорганізми та речовини мікробного походження, які за природного способу введення зумовлюють позитивні ефекти на фізіологічні, біохімічні та імунні реакції організму хазяїна внаслідок оптимізації та стабілізації його мікробіоти [3]

За сучасною класифікацією препарати для корекції мікробіоценозу поділяють на шість основних груп:

1. монокультури живих мікроорганізмів, які містять представників нормальної мікрофлори кишечнику (монокомпонентні препарати);

2. комплекс живих мікроорганізмів (дво - та чотири штамові пробіотики, полікомпонентні препарати, симбіотики);

3. субстанції, оральне введення яких стимулює ріст і розмноження індигенної флори (пребіотики);

4. монокультури чи комплекс мікроорганізмів і субстанції, що стимулюють їхнє приживлення, ріст та розмноження (синбіотики);

5. генно-інженерні штами мікроорганізмів із заданими властивостями, їхні структурні компоненти та метаболіти (рекомбінантні пробіотики);

6. інші сполуки мікробного, рослинного або тваринного походження крім мікроорганізмів або стимуляторів їхнього росту та розмноження, які позитивно впливають на функції клітин органів і тканин людини (полі компонентні комбіновані препарати).

Пробіотики можуть містити як один штам (монопробіотики), так і кілька (від двох до 30) штамів мікроорганізмів (асоційовані пробіотики) [4].

На сьогодні вченими [4] виділено переваги наступних типів пробіотичних бактерій:

• *Lactobacillus acidophilus* (DDS-1 і NAS супер штами) бактерій, що розщеплюють білки в тонкому кишечнику і допомагають максимізувати поглинання їжі;

• *Bifidobacterium bifidum* 1 (Malyoth супер штам) бактерій є переважаючими, доброзичливими жителями товстої кишки. Вони допомагають запобігти вторгненню шкідливих мікробів.

• *Lactobacillus bulgaricus* (LB -51 супер штам) бактерій розщеплюють білки, сприяють максимальному поглинанню поживних речовин, і виробляють речовини, які допомагають іншим корисним бактеріям прилипати до стінки кишечника [7].

Для обгрунтування вибору бологічного агента з метою виробництва біомаси наводимо порівняльну таблицю продуцентів (таблиця 2.1.1)

Таблиця 2.1.1

Узагальнена характеристика Біфідобактерій

Біологічний агент	**Склад поживного серидовища г/л**	**Особливості процесу культивування**	**Концентрація Живих клітин,КУО/мл**	**Використана література**
Bifidobacterium longum Л	$MnSO_4$ - 0,25 $ZnSO_4$ - 3 KJ - 2,5 $CuSO_4$ - 0,1 $FeSO_4$ - 0,1 Селексен - 0,05 Молоко- доводять до 1 л	pH-7.0 22 год	$1 \cdot 10^6$	RU 2515048. Способ культивирования бифидобактерий в молоке // *Кузин А. А., Кузина Д.А.*
Bifidobacterium bifidum ATCC 11863	Глюкоза - 10 Дріжджовий екстракт– 10 Пептон– 10 М`ясний екстракт– 10 Ацетат натрія- 5 Амоній цитрат- 5 L-цистеїн K2 HPO4 – 2 MgSO4 - 2 MnSO4 – 0,1	pH- 6.2, ± 0,1 48 год	$1 \cdot 10^7$	*Zarinah Zakaria1, Anis Amalinafitri Afandi Siti Nuriah Mohd Noor1, Napisah Hussin2 a Norshazila Shahidan1 //* Prebiotic Activi Score Of Breadfruit Resistant Star (Artocarpus altilis), Breadfruit Flour, A Inulin during In-Vitro Fermentation By Pu Cultures (Lactobacillus Plantarum, A Bifidobacterium Bifidum) *// J. Agrobiotec* 2018-.Vol 9 - . N 1 *P* 123-127.
Bifidobacterium bifidum 1	Соева сироватка -50 Лактоза-1.0 Аскорбінова кис-0.5 Натрій лимоннокислий три заміщений – 6 KH_2PO_4-2 $MgSO_4$-1,2 агар-агар-2,5 вода дист- решта	pH-6.8-7.0 30 год	$1 \cdot 10^8$	Патент № 107738. Композиц інгредієнтів для культивування бактер роду *Bifidobacterium* // *Крупицька Л.* *Капрельянц Л. В, Труфкаті Л В.*

Короткий опис таблиці

Bifidobacterium longum Л

Даний мікроорганізм культивують в пастеризованому знежиреному молоці, в яке додають мінеральні та органічне з'єднання Відомий спосіб вирощування біфідобактерій , який передбачає внесення в знежирене молоко в якості стимулятора росту біфідобактерій наприклад сироваткового сиропу в кількості 5,0-6,0% до маси молока, отриманого шляхом ферментації освітленої згущеної сироватки β-галактозидази або селексену.

Недоліком даного способу культивування є тривалість процесу, отримання недостатньо високої кількості біфідобактерій і значне збільшення вуглеводної складової одержуваного продукту.

У молоці біфідобактерії розвиваються повільно, оскільки коров'яче молоко не є природним середовищем їх існування. Однією з причин поганого росту біфідобактерій у молоці може служити розчинений у ньому кисень, тому що біфідобактерії – суворі анаероби. Тому одним зі способів стимулювання їх росту при виробництві молочних продуктів є використання адаптованих до молока штамів біфідобактерій, здатних розвиватись у присутності незначної кількості кисню.

Bifidobacterium bifidum ATCC 11863

Даний штам володіє високою концентарцією КУО , проте має досить складне поживне середовище, яке містить багато стимуляторів росту та білкових гідролізатів, оскільки для промислового культивування пробіотичних продуцентів середовище має буди складним оскільки пробіотичні молочнокислі бактерії роду *Bifidobacterium* є ауксотрофами і потребують наявності великої кількості факторів росту, джерел амінокислот та вітамінів. Культивування проводиться при температурі 37 ^{0}C при pH 6.2 - 0.1 протягом 48 години.

Bifidobacterium bifidum 1

У випадках технологічного виробництва використовують соєву сироватку, осільки речовина рослинного походження , будучи природніми акумуляторами біологічного активних речовин , у тому числі вітамінів , ферментів , амінокислот,

мікро - і макроелементами в поєднанні з традиційними пробіотичними штамами , надають більш лікувальний ефект . Крім цього рослинна сировина є менш дорогою , ніж сировина тваринного походження .

Для точного порівняння рентабельності застосування продуцентів порівняємо вартість поживних середовищ та цільового продукту, для співставлення економічної доцільності впроваджень зазначених технологій у виробництві. (табл.2.1.2, та табл.2.1.3)

Таблиця 2.1.2

Порівняння вартості поживних середовищ для одержання пробіотика продуцентами *Bifidobacterium longum* -Л, . *Bifidobacterim bifidum*- ATCC 11863, *Bifidobacterium bifidum* 1

Продуцент	**Компонент поживного середовища , (концентрація) г/л**	**Ціна компонента , грн/кг**	**Вартість компонента (грн.)на 1 л середовища**	**Джерело інформації**
Bifidobacterium longum -Л	$MnSO_4$ -0,25	24,20	0.0058	24
	$ZnSO_4$ - 3,00	30	0.09	25
	KJ - 2,5	1.7	0.0042	26
	$CuSO_4$ - 2	87	0,174	27
	$FeSO_4$ - 1	9,8	0,0098	28
	Селексен - 0,2	800	1.6	29

Продовження таблиці 2.1.2

Продовження таблиці 2.1.2

	Молоко	8	1000	9
Вартість 1 літра середовища -9,88 грн				
Bifidobacteria bifidum, ATCC 11863	Глюкоза - 10	25	0,25	10
	Дріжджовий екстракт– 10	108	1,08	11
	Пептон– 10	135	1,35	12
	М`ясний екстракт– 10	675	6,75	13
	Ацетат натрія- 5	28,6	0,143	14
	Амоній цитрат- 5	75	0,375	15
	L-цистеїн- 1	685	0,685	16
	K_2HPO_4 - 2	104	0,208	20
	$MgSO_4$ - 2	22	0,044	22
	$MnSO_4$ – 0,1	24,20	0,0024	24
Вартість 1 літра середовища – 10,91 грн				
Bifidobacterium bifidum 1	Соєва сироватка- 50 (гідромодуль для екстракції 1:5 (1 частина зерна та 5 частин води) тобто 16,6 % зерна сої	17	0,141	18
	Лактоза-1	56	0.056	19

Продовження таблиці 2.1.2

Завершення таблиці 2.1.2

	Аскорбінова кис-0.5	305	0.1525	20
	Натрій лимоннокислий три заміщений –6	48	0.288	23
	Калій фосфорнокис двозаміщний-2	104	0.208	21
	магній сірчанокислий- 1,2	22	0.0264	22
	Пептон- 1	135	0,135	12
	Агар-агар – 2,5	135	0,337	45
Вартість 1 літра середовища -1.37 грн				

У табл.2.1.2 наведена вартість компонентів поживного середовища та вартість 1 літра середовища для культивування продуцентів .Ціна встановлена відповідно :*Bifidobacterium longum* Л - 9.88 грн/л ; *Bifidobacterim bifidum* 1 - 1.37грн/л; *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863-10.91 грн/л.

Навидимо узагальнену таблицю (табл.2.3) співвідношення вартості поживних середовищ , концентрація вихідного продукту та час культивування.

Таблиця.2.1.3

Співвідношення вартості поживних середовищ , виходу продукту та умовної вартості пробіотику у продуцентів *Bifidobacterium longum* Л, *Bifidobacterim bifidum* 1, *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863

Біологічний агент	**Вартість 1 л Середовища грн**	**Концентрація живих клітин,КУО/мл**	**Час культивування, год**	**Продуктивність по біомасі(КУО/год)**	**Умовна кількість КУО за одну гривню (КУО/грн)**	**Література**
Bifidobacterium longum Л	9,88	$1*10^6$	22	$0,0045*10^7$	$0,01*10^7$	6
Bifidobacterium bifidum ATCC 11863	10,22	$1*10^7$	48	$0,0205*10^7$	$0,097*10^7$	7
Bifidobacterium bifidum 1	1,37	$5*10^{11}$	30	$0,16*10^{11}$	$3,64*10^{11}$	5

Загальний аналіз та обрання продуцента

Bifidobacterium longum Л -продуцент з найбільш низькою концентрацією КУО- основним цільовим продуктом, ціна поживного середовища у даного продуцента становить – 9,88 грн за літр, що відносно досить дорого тим паче концентрація КУО тут найнижча, а відповідно при часу культивування 22 години продуктивність по біомасі буде найнижча($0,0045*10^7$ КУО/год). Умовна вартість КУО(кількість КУО на гривню у даного штаму теж найнижча. У даному випадку нашому питанні виграє велику роль компоненти які є дешевими, доступними та ті що зможуть збагачувати продуценти . Поживне середовища має компонент селексен (селеноксантен) , який важко знайти .Також у молоці біфідобактерії розвиваються повільно, оскільки коров'яче молоко не є природним середовищем їх існування. Культивування є тривалим процесом, отримання недостатньо

високої кількості біфідобактерій і значне збільшення вуглеводної складової одержуваного продукту.

Bifidobacterium bifidum 1 є дуже перспективним штамом, оскільки має найменшу вартість поживного середовища у 1,37 грн , через те, що воно складається з легкодоступних та дешевих компонентів(соєва витяжка лактоза, солі) відповідно цей продуцент має і найдешевшу вартість КУО і найбільшу їх концентрацію у $5*10^{11}$ КУО/мл, також час культивування становить 30 годни, це значення трохи більше ніж у попереднього проте менше ніж у наступного відносно інших продуцентів, як і умови культивування типу pH температура та інші не сильно відрізняються, отже і продуктивність по біомасі у даного штаму найбільша. Через високі значення КУО цей штам має найвищу продуктивність по КУО та найбільшу кількість КУО на 1 гривню по вартості. Оскільки даний продуцент має найбільш вигідні співвідношення вартості поживного середовища та кількості КУО він є досить перспективним[6].

Bifidobacterium bifidu ATCC 11863, як класичний пробіотичний ауксотрофний продуцент містить у складі поживного середовища велику кількість джерел факторів росту : дріжджовий та м`ясний екстракт, пептон цистеїн, оскільки без додавання цих компонентів даний мікроорганізм не зможе рости. Відповідно вартість поживного середовища у даного продуцента найвища: 10, 9 грн/л . однак він має досить непогану концентрацію біомаси: 10^7 КУО/мл. А враховуючи час культивування у 24 години і досить непогану продуктивність по біомасі $0,041*10^7$ КУО/год поступаючись лише попередньому продуценту. Вартість КУО у даного штаму найвища завдяки дорогому поживному середовищу. Однак складний багатокомпонентний вміст середовища дає майже 100% гарантію того, що при культивування на даному поживному середовищі продуцент буде рости стабільно і з постійною продуктивністю, оскільки середовище на якому пропонується культивується штам найбільш підходить для ауксотрофних мікроорганізмі у даному випадку для роду *Bifidobacterium*[7].

Обрання продуцента

У підсумку аналізу 3 продуцентів для культивування з метою одержання препарату біфідумбактерин обираємо штам *Bifidobacterium bifidum* 1, оскільки він характеризуєтсья найвищою концентрацією біомаси у КУО = $5*10^{11}$ КУО/мл, високою продуктивністю у часі по біомасі($0,16*10^{11}$ КУО/год),також він має найменшу вартість КУО оскільки середовище для культивування є дуже дешеве($3,64*10^{11}$ КУО/грн), *Bifidobacterium bifidum* 1 , як продуцент не містить у складі середовища дорого вартісні та важкодоступні компоненти на відміну від інших штамів. Даний продуцент має не найменшу, проте і не найвищу тривалість культивування у 30 годин, що може зекономити енергоресурси на підтримання культивування. Інші параметри культивування не сильно відрізняються.

Отже всі вищезазначені характеристики продуцента ставлять його в беззаперечне виграшне становище. Тож обираємо даного продуцента

2.2 Розрахунок складу поживного середовища

Середовище містить такі джерела основних елементів:

Джерело вуглецю(г / літр):

Лактоза (1 г)

Пептон (1г)

Соєва витяжка(50 г з них 16,66% сухі речовини) містить 32% вуглеводів .

Пептон- гідролізат білка казеїну містить 50% вуглецю та 15% азоту, дріжджовий екстракт містить 47% вуглецю та 10 % азоту, м`ясний екстракт являє собою білкову витяжку з м`яса яловичини тож як і всі білкові речовини містить 50% вуглецю та 15 % азоту[8,9,10]

Джерело азоту

Соєва витяжка(білки 55%)

Пептон(1 г білки те саме)

Розрахунок по вуглецю

Основним джерелом вуглецю є лактоза та цукри соєвої витяжки з них 60% становить сахароза

Відсоток вуглецю у лактозі (6 атомів молекулярною масою 12 кожний):

$$□_1 = \frac{100 \times 72}{180} = 40\ \%\ (2.2.3)$$

Розраховуємо масу вуглецю у 1г/л лактози :

$$G = \frac{40 \times 1}{100} = 0{,}4\ г/л\ (2.2.4)$$

Вміст вуглецю у соєвій витяжці буде наступний:

Вміст у білках сої:

(50*0,166)*0,55 =4,55г/л білків у сої

Вміст карбону у білках становить 50% відповідно:

4,55*0,5 = 2,27 г/л карбону

Вміст у вуглеводах сої

Основу вуглеводів сої становить сахароза(її мономером є глюкоза) тож відсоток карбону у більшості вуглеводах буде такий же як і у сахарози. У сої 32 % вуглеводів які можуть метаболізуватися всіма мікрорганізмами з яких 60% сахароза.

Маса вуглеводів буде становити:

(50*0,166)*0.32 = 2,656 г/л (2.2.1)

Відсоток вуглецю у сахарозі (12 атомів молекулярною масою 12 кожний):

$$□_2 = \frac{100 \times 144}{342} = 42{,}1\ \%\ (2.2.2)$$

Розраховуємо масу вуглецю у 2,656г/л лактози :

$$G = \frac{42{,}1 \times 2{,}656}{100} = 1{,}11\ г/л\ (2.2.3)$$

У пептоні міститься 55 % білків в яких 50% карбону відповідно 1 г пепону містить 0,55 г білків і з них 50% карбону це буде 0,275 г/л карбону

Загальна маса вуглецю становить: (1,11+0,4+2,27+0.275)= 4,055.

Тобто для біосинтезу біомаси стане : 4,055 г/л карбону. Вміст карбону у біомасі становить 50 %, враховуючи, що половина вуглецю піде на холосте окиснення(50% це половина тобто 2,025 г то для біосинтезу залишиться 2,025 г вуглецю . з яких при вмісту карбону у біомасі 50% утвориться 4,055 г/л біомаси[8, 9, 10]

Розрахунок по азоту

Основним джерелом азоту є пептон та соєва витяжка

Відсоток азот у пептоні та соєві витяжці міститься у білках. Відсоток білків у перерахунку на суху речовину у цих компонентах 55 % Вміст азоту у білках 15%[32]:

Маса білків у соєвій витяжці:

$$G\ 1= (50*0,166)*0.55 = 4,55 \text{ г/л} \quad (2.2.1)$$

Маса азоту у витяжці:

$$W = 4,55*0,15 = 0,682 \text{ г/л} \quad (2.2.2)$$

Маса білків пептоні :

$$G\ 1= 1*0.55 =0.55 \text{ г/л} \quad (2.2.3)$$

Маса азоту у витяжці:

$$W = 0,55*0,15 = 0,082 \text{ г/л} \quad (2.2.4)$$

Загальна маса азоту становитиме:

$$W_з = 0,082+0.682 = 0,764 \text{ г/л} \quad (2.2.5)$$

Враховуючи, що вміст азоту у біомасі становить 10-15 % (приймаємо 10%) з 0.764 г азоту може утворитися 7,64 г біомаси.

Висновок : Після проведення розрахунку було встановлено, що на синтез біомаси піде 0.764 г/л азоту та 2,055 г/л вуглецю, При такій концентарції органогенних елементів може утворитися 4,055 г/л біомаси. Лімітувальним фактором при даному складі поживного середовища буде карбон. Оскільки азоти вистачить на 7,64 г/л біомаси а карбону вистачить лише на 4,055 г/л.

2.3 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

2.3.1 Морфолого культуральні ознаки

Біфідобактерії представляють собою поліморфні палички з біфуркаціями на одному чи двох кінцях (рис. 2.3.1), які розташовуються у вигляді скупчень або окремих клітин, парами, ланцюгами, полісадом чи розетками. Нерухомі, спор не утворюють. Грампозитивні, забарвлення часто нерівномірне. Ці палички досить варіабельні. На ранніх стадіях розвитку в популяції спостерігаються переважно

палочкоподібні клітини довжиною до 8 мкм, товщиною в середньому 0,4 – 0,5 мкм. Клітинна стінка однорідної густини, [11].

Рис.2.3.1 Морфологія біфідобоктері

товщиною 16 нм, іноді зустрічаються ділянки нерівномірної товщини. Цитоплазматична мембрана має структуру з трьох шарів сумарною товщиною 9 нм. Розмноження відбувається шляхом формування поперечних перогородок. На рівні сформованої септи в поперечній перегородці клітинна стінка товща бічної. Поступово в культурах з'являється сильно виражений поліморфізм бактеріальних клітин . Розмноження може відбуватися одночасно чи послідовно на деяких тіла однієї клітини чи її відростків, внаслідок чого утворюються ланцюги клітин нерівномірної довжини без ознак відокремлення особин, що входять у їх склад. В пізніший термін культивування в популяціях переважають ланцюги чи конгломерати клітин, частина з подвоєними кінцями, які продовжують рости в довжину. Ці особливості морфології біфідобактерій можна вважати реакцією на умови середовища, в якому вони мешкають, що виявляється на клітинному і популяційному рівнях [11,12]

2.3.2 Фізіолого-біохімічні ознаки

Біфідобактерії мають ряд особливостей венергетичному обміні, потребі в ростових факторах. Являючись анаеробами, вони можуть почати ріст лише у відсутності кисню і при достатньо низькому окисно-відновному потенціалу середовища. В тонкому відділі кишечника через низький pH і достатньо високий рівень кисню можливий лише незначний ріст мікроорганізмів.[13,14] Вже в

процесі формування захисних біоплівок відбувається більш стабільне розселення мікрофлори по специфічним для них локусам. Біфідобактерії, як найбільш строгі анаероби, колонізують найближчу до епітелію зону, де завжди підтримується від'ємний окисно-відновний потенціал (причому не лише в товстій кишці, а й в інших, більш аеробних біотопах організму: в ротоглотці, піхві, на шкіряних покровах). Хемоорганотрофи. Активно збродживають вуглеводи з утворенням оцтової і молочної кислоти. Потребують вітаміни. Газоутворююча властивість, каталазоутворююча властивість, здатність розрідження желатиту відсутні . Біфідобактерії стійкі до канаміцину, мономіцину. Чутливі до антибіотиків пеніцилінового ряду, гентаміцину .

2.3.3 Особливості метаболізму біологічного агенту

Для росту і розвитку продуцента в поживних середовищах необхідна наявність в потрібній кількості і в засвоюваній формі поживних речовин.

B. Bifidum 1 здійснює молочнокисле бродіння, оскільки у процесі збродживання глюкози утворюється тільки молочна кислота та ацетат .

Глюкоза каталізується за гліколітичним шляхом. Ключовими ферментами в даному процесі є фосфофруктокіназа та піруваткіназа. Водень, який відщеплюється під час дегідрування гліцеральдегід-3-фофату у вигляді НАДН, передається на піруват

У присутності лактатдегідрогенази піруват відновлюється до лактату. Лише невелика частина пірувату декарбоксилюється та перетворюється на оцтову кислоту, етанол і CO_2, а також ацетон [15]

2.4.Таксономічний статус біологічного агента

Вперше біфідобактерії були виділені і описані H.tissier ще в 1900 році , який назвав видільний штам Bacillus bifidus comunis . Однак протягом досить тривалого періоду протилежність думок різних авторів стосовно систематики біфідобактерій стримувала встановлення таксономії цих мікроорганізмів і залишили практично не розробленою їх видову діагностику .

Значний прогрес у галузі систематики біфідобактерій почав спостерігатися у другій половині XX ст. після встановлення домінуючої ролі цих мікроорганізмів

у складі мікрофлори ШКТ дітей , а також їх позитивного впливу на організм людини . Так ,G. Reuter відніс біфідобактерій до самостійного роду Bifidobacterium Orla-Jensen

З розвитком молекулярно-генетичних і з застосуванням їх у систематиці мікроорганізмів удосконалювалась і таксономія , що дозволило роздобити їх класифікацію . Була розширена фенотипові характеристика дослідження геному біфідобактерій , визначено нуклеотидних склад ДНК і застосовано метод гібридизації ДНК-ДНК , що дозволило удосконалити класифікацію і виявити нові види бактерій роду Bifidobacterium – B.dentium , B. Catenulatum , B.angulatum. бу включений в 15-ту частину ‘ Irregular nonsporing gram-positive rods’ (< Грам позитивні неспороутворюючі палички неправильної форми >) без об’єднання в будь яку родину і містив вже 24 види з типовим видом *Bifidobacterium bifidum 1* .

За останні часи після опублікування 9-го Керівництва по визначенню бактерій . бергі на основі аналізу даних про послідовності рДНК було запропоновано види : b.gallicum, b.inopinatum, b.psychraephilam та ін.Крім того P.J.Simpson зі співав. На основі данних послідовності гену 16s рРНК запропонували створити новий рід Aeriscardovia , а китайські вчені описали два нових види біфідобактерій : Scardocia , Parascardovia

Застосування сучасних методів дослідження на молекулярному рівні дозволило підійти з позиції філогенії до розуміння місця біфідобактерій серед інших бактерій . E.Stackebranndt зі співав. , підсумовуючи отримані раніше дані аналізу будови 16s гену рибосоиної РНК, запропонували нову класифікаційну структуру біфідобактерій , де вони відносяться до класу Actinobacteria, порядку Bifidobactereales і утворюють родину Bifidobacteriaceae , типовий рід - Bifidobacterium .

Таким чином , на даний час описано 31 вид біфідобактерій , які в останні роки були доповнені трьома новими родами[16].

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обгрунтування

3.1 Потреба у цільового продукті

Пробіотики - численна група лікраських засобів, що призначаються для прийому, як самостійно так і у комплексі як компенсуючий агент (наприклад паралельно з курсом антибіотикотерапії). Також застосовуються для профілактики і лікування захворювань та станів пов`язаних із порушеннями системи шлуково-кишкового тракту, а саме з балансом мікрофлори ШТК. Пробіотики на основі молочнокислих бактерій застосовують зазвичай як засіб для відновлення мікрофлори кишечника після прийому антибіотиків при лікуванні відповідних хвороб. А також для лікування специфічних колітів та дисбактеріозних станів[17].

Для розрахунокового визначення потреби у пробіотичному препараті на основі *Bifidobacterium bifidum* 1 будемо користуватися статистичними даними Державної служби статистики України та даними Центру громадського здоров`я МОЗ України. Дані будуть братися за період з 2018 по 2019 рр. Оскільки застосування пробіотиків на основі біфідобактерій ділиться на: лікування дисбіозних станів та відновлення мікрофлори після антибіотикотерапії то при розрахунку потреби будуть враховуватися ці 2 типи захворювань(станів)(табл 3.1.1)[18,19].

Оскільки на ринку України існує велике різноманіття і конкуренція серед пробіотичних препаратів на основі молочнокислих бактерій необхідно враховувати дану особливість, а також необхідно прийняти середню дозу препарату для подальшого розрахунку. А оскільки для цього необхідно створити перелік найбільш популярних пробіотичних препаратів даної категорії з дозуванням та іншими особливостями, наводимо узагальнену таблицю пробіотичних препаратів на основі молочнокислих бактерій які застосовують для лікування та корекції станів однієї групи представлених на ринку України як закордонного так і вітчизняного виробництваж.(табл 3.1.1).

Таблиця 3.1.1

Порівняльна таблиця пробіотичних препаратів з використанням молочнокислих бактерій представлених на ринку України [20-30]

Назва препарату	**Вміст КУО на дозу**	**Дозування при лікування на добу 1 людини**	**Курс лікування, діб**	**Форма**	**Загальна кількість доз на курс**	**Ціна за упаковку та кількість доз, грн; кількість доз на упаковку**	**Ціна за курс лікування, грн.**	**Виробник**	**Література**
Альфлорекс	$1*10^9$	1 раз на добу	28	Капсули № 30	28	688,00; на 30 капсул	642	« SYMBI-SYS» Італія	[20]
Симбітер (ацидофільний)	$1*10^9$(лише біфідобактерій)	1 пакетик на 10г 1-2 рази на добу	14	Пакетики з порошком для розведеня	28	300.00; грн , 10 пакетиків	840,00	ТОВ ОД«Пролісок» Україна	[21]

Продовження таблиці3.1.1

Продовження таблиці3.1.1

Puritan's Pride Probiotic 10	$2,2*10^9$(біфідобактерій), сумарно 20 $*10^9$	2 дози 1 раз на добу	30 діб	Капсули	60	417,00грн 100 доз	250, 2	Puritan`s Pride Ltd. США	[22]
Оптілакт	$5*10^9$	1 саше на добу	24 діб	Саше	24	157; 10 саше	376,8	ТОВ «Фарма Старт»	[23]
Лациум	$1*10^9$	1 доза 2 рази на добу	14	саше	14	264,00 грн 14 саше	246,00	«Winclove Probiotics», Нідерланди.	[24]
Биоформула	$1,3*10^9$	2-3 рази на добу	31	капсули	93	171 грн 30 капсул	533 грн	Com. Healthyclopedia Ltd. Poland	[25]
Полібактерин	$1*10^8$	3 рази на добу	10	таблетки	30	95,00 за 60 капсул	47,50	Амфита НПФ ООО. Росія	[26]
Лінекс	$1,2*10^7$	2 капсули 3 рази на добу	3 тижні(21 доба)	Капсули	126	127,50 ; 7 капсул	2295,00	Лек фармацевтична компанія д.д., Словенія	[27]

Продовження таблиці3.1.1

Завершення таблиці3.1.1

Біфідумбактерин	$1*10^8$	5 доз 3 рази на добу	2-4 тижні(14-28 діб)	Порошок для приготування суспензій	420	124,60; 5 доз	10466,00	ТОВ «Фармацевтичний завод „Біофарма	[28]
Лактобактерин	$2*10^9$	6-10 капсул 2 рази на добу	3-4 тижні(21-28 діб)	Капсули	560	150,00; 10 капсул	8400,00	ТОВ «Фармацевтичний завод „Біофарма	[29]
Лактиаліє	$1*10^8$	2 капсули один раз на добу	4 тижні(28 діб)	Капсули	56	160,00; 30 капсул	298.66	ПАТ «Фармак», Україна, 04080, м. Київ	[30]

**Примітка 1* . Оскільки дозування у рідних пробіотичних препаратів різне і не спостерігається чіткої залежності між курсом лікування чи профілактики та дозуванням чи концентрацією АФІ у подальших розрахунках буде використовуватися середнє приняте значення дози або кількості пробіотичного штаму у г(біомаси)

Препарати Українського виробництва: Симбітер (ацидофільний), Оптілакт, Біфідумбактерин, Лактобактерин.

Аналіз таблиці

Дані з таблиці, що описує застосуванням пробіотиків в середньому на людину припадає 1-2 дози , а курс лікування становить 21-28 днів наприклад: Біфідумбактерин, Лактобактерин та Лінекс,. Половина із представлених препаратів є закордонними, а тому зростає перспектива розробки вітчизняного препарату на основі біфідобактерій.

Так як дозування препарату для кожного з цих пробіотиків не є однаковим необхідно прийняти середнє значення дози препарату яка приймається в 1 прийом. Приймаємо за одиницю дози(лікарську форму) капсули. Для пробіотичних препаратів використовують капсули №30. Вміст капсули зазвичай становить 300, 500, 600 мг[23,25] суміші допоміжних речовин та біомаси пробіотичного штаму. На одну дозу припадає $1*10^8$ – $1*10^9$ КУО/дозу. Для Біфідумбактерину це становить $1*10^8$.

Приймаємо заповнення капсули у 500 мг. Вміст допоміжних речовин приймаємо 200 мг, тоді залишок на ліофілізовану біомасу пробіотичного штаму у захисному середовищі буде становити 300 мг. Приймаємо співвідношення біомаси пробіотичного штаму і захисного середовища 1:2. Тоді кількість біомасу буде становити 100 мг, а захисного середовища відповідно 200 мг.

У підсумку: на 1 дозу припадає 100 мг ліофілізованої біомаси пробіотичного штаму, концентрація КУО у якій після всіх операцій виробництва становить не менше $1*10^8$ КУО. Для профілактики та лікування хвороб та станів пов`язаних з антибіотикотерапією та дисбіозами приймаємо: курс прийому у 28 днів, частота прийому- 2 рази на день(добу).

Для подальшого ходу розрахунку потреби необхідно навести групи захворювань при яких призначають відповідний препарат, перш за усе це шлунково-кишкові інфекції та хвороби при яких проходять курс антибіотикотерапії (*Табл3.1.2*)

Таблиця 3.1.2

Статистика захворюваності населення на хвороби та хворобливі стани при яких пробіотики виступають як основні діючі лікарські засоби так і як обов`язкові додаткові при антибіотикотерапії[18,19]

Група захворювань	Кількість хворих за 2018-2019 рр	Середня доза препарату, на 1 людину	Доза по кількості біомаси	Кількість доз у на 1 людину при курсі лікування : раз на добу, рази	Тривалість курсу прийому, днів	Загальна кількість доз при лікуванні, шт	Загальна сумарна кількість біомаси при лікуванні, мг
Гострі кишкові інфекції	57910	500 мг(1 капсула)	100 мг	2 прийоми	28 днів	56	5600 мг
Шигельоз	508						
Гастроентероколіти	30066						
Кашлюк	1449						
Скарлатина	8836						
Сальмонельозні інфекції	5195						
Лептоспіроз	148						
Менінгококова інфекція	202						
Хвороба Лайма	3083						

**Примітка 2* Для вказання дози препарату, тривалості курсу лікування та кількості препарату на людину впродовж курсу лікування вище зазначені значення взяті як усереднені з табл *3.1.1*

Розрахунок потреби у цільовому продукті

За статистикою 2018-2019 рр було зареєстровано наступну кількість випадків захворювань : 57910 хворих на гострі кишкові інфекції, 508 –на шигельоз, 30066 на гастроентероколіти, 5195 на сальмонельози. Також були зареєстровані випадки захворювань на кашлюк- 1449, скарлатину- 8836, лептоспіроз- 148, менінгококову інфекцію- 202 та хворобу Лайма- 3083. При цих захворюваннях після закінчення антибіотикотерапії завжди призначають пробіотики. А при перших 3 пробіотики призначають як лікувальний засіб або для профілактики. Дана кількість хворих, зареєстрованих за певний період є загальною для всього населення. Людям з цими групами захворювань найчастіше призначають пробіотики.[4,17]

Загальна кількість людей, у яких виявили дані захворювання : $К_{заг}$ = 57910+508+30066+1449+8836+5195+148+202+3083 = 107397 людей, у перерахунку на все населення України.

Прийнято, що на 1 людину приймає 56 доз препарату, який містить 100 мг біомаси активного штаму.

Кількість біомаси пробіотичного штаму на 1 прийомний курс становитиме:

$$К_{біом} = (56 \times 100) = 5600мг = 5{,}6 г$$, де

56- кількість доз на курс лікування

100- прийнята маса пробіотичного штаму у 1 капсулі(дозі)

Загальна річна потреба у пробіотику(г біомаси) для хворих на вище зазначені хвороби у перерахунку на населення становитиме:

$G_{потреби}$= 5,6 ×107397 = 601423,2 г = 601423,2 г = 601,42 кг

107397 – кількість хворих що потребують пробіотик з усього населення України.

Отже загальна потреба становить 601423,2 г= 601,42 кг

Наводимо таблицю з узагальненою потребую у біомасі пробіотичного штаму(табл 3.1.3)

Таблиця 3.1.3

Узагальнена потреба у пробіотиках виражена у біомасі пробіотичного штаму для населення України.[18,19]

Група захворювань	Кількість хворих за 2018-2019 рр	Середня доза препарату, на 1 людину	Доза по кількості біомаси	Кількість доз у на 1 людину при курсі лікування : раз на добу, рази	Тривалість курсу прийому, днів	Загальна кількість доз при лікуванні, шт	Загальна сумарна кількість біомаси при лікуванні, мг
Гострі кишкові інфекції	57910	500 мг(1 капсула)	100 мг	2 прийоми	28 днів	56	5600 мг
Шигельоз	508						
Гастроентероколіти	30066						
Кашлюк	1449						
Скарлатина	8836						

Продовження таблиці 3.1.3

Завершення таблиці 3.1.3

Сальмонельозні інфекції	5195						
Лептоспіроз	148						
Менінгококова інфекція	202						
Хвороба Лайма	3083						
Усього	**107397**	**500**	**100**	**2**	**28**	**56**	**5600**
Усього біомаси	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**601,42кг**

3.2 Розрахунок потужності виробництва

Пробіотики на основі лактобактерій відносять до БАД ніж до лікарських засобів. Хоча деякі з ниє підпадають під «гриф» ЛЗ в Україні. Як таке виробництво «in bulk» пробіотиків у Україні не дуже поширене, оскільки Україна є досить потужним виробником біомаси пробіотичних штамів(АФІ) для пробіотиків.

Тому пробіотики закордонного походження на території України продаються як звичайні закордонні готові лікарські препарати чи БАД. Проте в Україні, незважаючи на велике різноманіття закордонних та вітчизняних пробіотиків, виробництво власних пробіотиків потребує розвитку у сфері розробки і виділення нових штамів, що може вивести україну на міжнародний ринок з торгівля БАД (пробіотиків).

Лідером з виробництва пробіотиків в Україні є ТОВ «Фармацевтичний завод „Біофарма, на рахунку якого близько 15 пробіотичних препаратів,Ю з яких 5 належать біфідобактеріям.

Найбільш розповсюдженими пробіотиками на основі біфідобактерій та інших молочнокислих бактерій є:

1) закордонні імпортовані «Бакорен» Росія; «Лінекс Форте» «Лек» фармацевтична компанія д.д., Словенія; «Lactipan Plus» Istituto Biochimico Italiano SpA, Мілан, Італія; «Lactocare» «PharmaSuisse», PharmaSuisse Laboratories S.R.L.; вул. Ларга, 7- 20122, Мілан, Італія, та інші Б) власного

виробнитва: «Біфідумбактерин», «Лактобактерин» ТОВ «Фармацевтичний завод „Біофарма.

Отже на ринку України найрозповсюдженіші є 2 пробіотики власного та 5 закордонного виробництва, які імпортуються вже як готові препарати. Як видно закордонні препарати мають більшу чисельність тож легше обираються споживачами і їм надають перевагу на ринку на сьогоднішній день, тому Україні необхідно впроваджувати власні виробництва пробіотиків на основі біфідобактерій, оскільки вони не є такі поширені як закордонні.

Щоб розрахувати потужність виробництва пробіотичного препарата на основі *Bifidobacterium bifidum* 1, потрібно від загальної потреби у біомасі пробіотика взяти 14 частину і чисельно перевести її на культуральну рідину.

14 частина означає, що пробіотик на ринку буде займати 14 місце оскільки буде варховуватися 13 одиниць на найбільш популярні пробіотичні препарати та 1 одиниця буде враховуватися на менш популярні препарати.

$$13+1= 14$$

$G_{гп}$ = (601,42)/ 14 = 42, 95 кг біомаси на рік, приймаємо 43 кг

14 –частина яку буде займати препарат на ринку.

3.3 Розрахунок об`єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для забезпечення потреби у пробіотику Біфідумбактерин в України необхідно виробляти 43 на рік. Продуктивність продуцента становить($Р_{кр}$): 4,055 г/л біомаси(0,0040 кг/л). Приймаємо вологість сухої біомаси 4 %, відповідно абсолютно сухої її буде $СР_{біом}$ =96%.

1)Розраховуємо яку кількість сухої біомаси можна отримати за добу, враховуючи кількість трудоднів ($V_{тдн}$ = 328).

$$А_{нтд} = А_{нт} / Т_{тдн} = 43 / 328 = 0,131 \text{ кг / добу}$$

2) Кількість продукту за цикл буде становити:

$$А_{цикл}=(A_{нтд} \times T_{цф})/24 = (0,131 \times 34)/24 = 0,185 \text{ кг /цикл}$$

3) Об`єм культуральної рідини, у якій можна отримати дану кількість біомаси(кг) за цикл з урахуванням втрат($E_{св}$ =18%) буде станвити:

$V_{кр} = (K_1 \times A_{цикл} \times CP_{біом})/(1 - E_{св}) \times P_{кр} = (1.1 \times 0{,}185 \times 0{,}96)/(1 - 0{,}18) \times 0{,}0040 = 59{,}56 = 60$ л/цикл

Кількість циклів ферментації буде становити:

4) $N_{цикл} = A_{нд}/ A_{цикл} = 43 /0{,}185 = 232{,}4 = 233$ циклів

$T_{цф}$ – цикл роботи ферментера(34 год), що включає час біосинтезу(24 год), та час підготовки ферментера- 10 год, K_1 –коефіцієнт запасу, що враховує ймовірність нестерильних операцій. Підготовка ферментатора включає: миття та огляд-2 год, перевірка на герметичність-2 год, стерилізація – 2 год, охолодження – 1 год, завантаження середовища – 1,5 год, засів- 0,5 год, відвантаження культуральної рідини- 1 год.

120 л культуральної рідини можна отримати у реакторі геометричний об`єм якого має становити(приймаємо коефіцієнт заповнення 0.65):

$$V_р = V_{кр}/ K_{зап} = 60/0{,}60 = 100 \text{ л}$$

Найближчий об`єм ферментера =200 л (обираємо ферментер компанії , BIOSTAT® D-DCU на 100 л [31]. Перераховуємо $K_{зап.}$

$K_з = V_{кр}/V_р = 60/100 = 0{,}6$, що не перевищує заданого значення.

**Примітка 1.3.1* Кількість виробничих трудоднів взято 328 , на рік , решта трудоднів буде розподілена на можливе технічне обслуговування апаратури.

.

3.4 розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{кр}$ = 60 л культуральної рідини. Враховуючи втрати культуральної рідини в результаті краплевиносу через колектор $E_ф$ (10-15 %).приймаємо втрати 10 %

Отже кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб}1 = V_{кр}/ (1-E_ф) = 60/(1-0{,}1) = 66{,}7 \text{ л}$$

Можливий геометричний об`єм буде становити:

$$V_Ф = V_{роб}1 / К_{зап} = 66,7 / 0,6 = 111,2 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий стандартний об`єм ферментера – 100 л(ферментер BIOSTAT D-DCU [31].

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$К_{зап} = 66,7 / 100 = 0,66$ поправляємо взятий раніше коефіцієнт заповнення.

Кількість поживного середовища в ферментері з поправкою на інокулят у 10%($X_ф$) буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб}1 / (1+X_ф) = 66,7/(1+0,1) = 60,6 \text{ л}$$

Звідси кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб}1 - V_{пс1} = 66,7-60,6 = 6,1 = 6 \text{ л}$$

Для одержання інокуляту обираємо ферментер-інокулятор на 10 л компанії BIOSTAT .D-DCU [31]. З коефіцієнтом заповнення 0.6.[31]

Для одержання 12 л в посівному апараті вираховуємо втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Приймаємо це за 10%

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

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

Кількість поживного середовища з поправкою на інокулят у 10%($X_ф$) буде становити:

$$V_{пс}2 = V_{роб}2 / (1+X_{ПА}) = 6,7/(1+0,1) = 6,1 \text{ л}$$

Звідси кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм2} = V_{роб}2 - V_{пс2} = 6,7-6,1 = 0,6 \text{ л} = 600 \text{ мл}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна отримати у колбах об`ємом 750 мл з коефіцієнтом заповнення 0.2

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу буде становити:

$$N = V_{пм}2 / (V_{колб} * К_{зк}) = 600/(750*0.2) = 4 \text{ штуки.}$$

Отже процес одержання біомаси штам *Bifidobacterium bifidum* 1 , буде складатися з трьох стадій і кінцева виробнича стадія буде проводитися у ферментері об`ємом 100 л з коефіцієнтом заповнення 0,66.

РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту

4.1 Шляхи катаболізму ростового субстрату у *Bifidobacterium bifidum* 1

Оскільки *Bifidobacterium bifidum* 1 культивують на середовищі, де основний компонент є соєва витяжка, яка містить близько 20 % сахарози основним джерелом вуглецю і енергії (ростовим субстратом) у середовищі для біосинтезу біомаси *Bifidobacterium bifidum* 1 є сахароза.

Згідно з Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes катаболізм сахарози у *Bifidobacterium bifidum* 1 проходить у вигляді молочнокислого бродіння, що являє собою модифікований шлях Ембдена-Мейєргрофа-Парнаса (гліколіз) з додатковими реакціями утворення лактату з пірувату, та відбувається без доступу кисню. На молочнокисле бродіння вказують ключові ферменти : зокрема лактатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.27).

Загалом катоболізм сахарози *Bifidobacterium bifidum* 1 дуже схожий на катаболіз у більшості представинків родини молочнокислих бактерій.

Так сахароза розщеплюється спочатку фосфорилюється за участі фосфорилази(КФ, 2.7.1.211), та розщеплюється на глюкозо-6-фосфат та фруктозу за участі бчета-фруктофуранозидази (КФ, 3.2.1.26). Глюкозо-6-фосфат відразу включається у гліколіз а фруктоза модифікується до фруткозо-6-фосфату фруктокіназою (КФ 2.7.1.4). Стадії гліколізу такі ж як і у більшості мікроорганізмів, до стадії з перетворенням пірувату, тут піруват під дією лактатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.27) частково перетворюється на лактат, та виділяється з клітини.

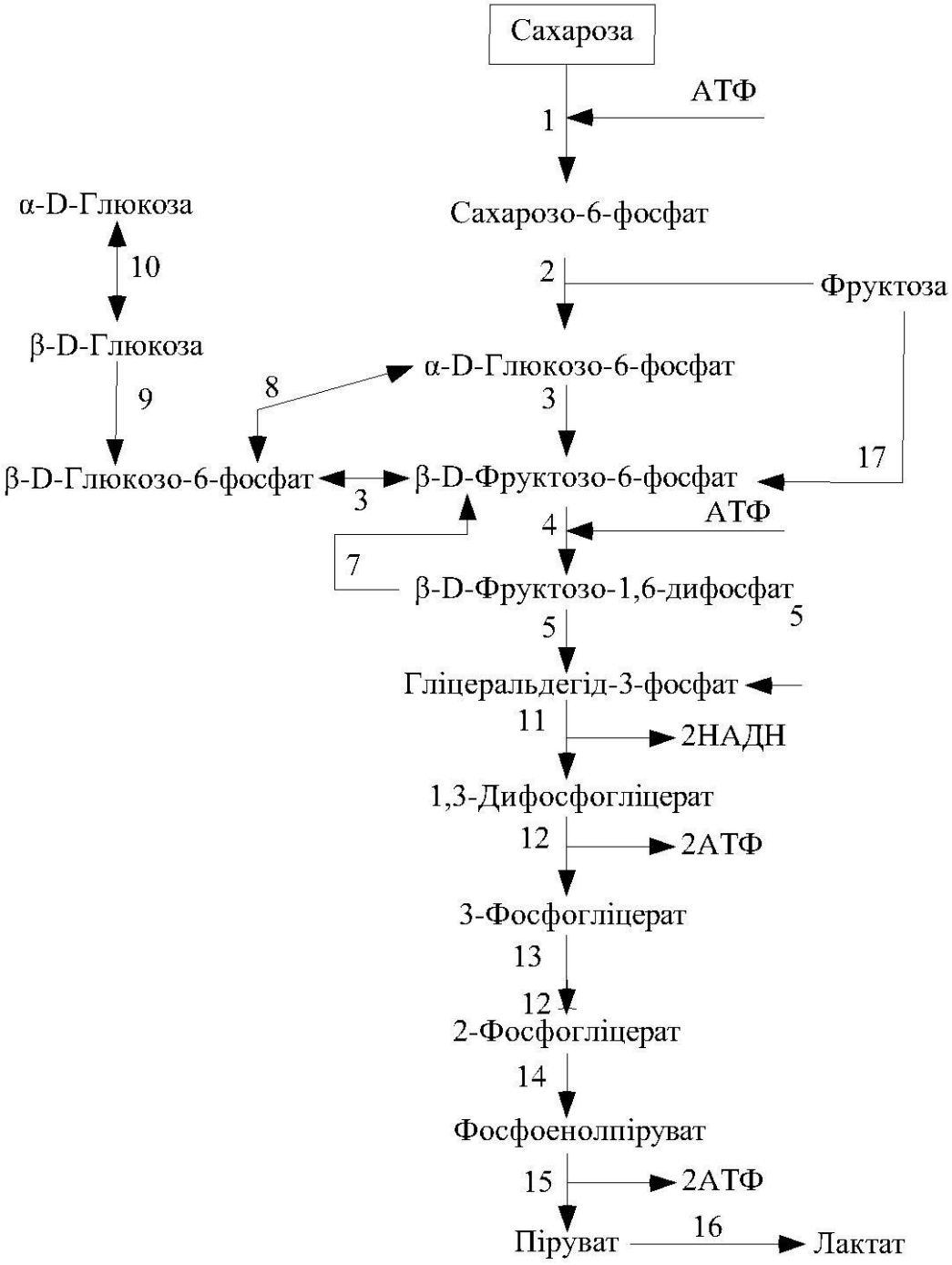


Рисунок 4.1.1 ***Катаболізм сахарози у Bifidobacterium bifidum*** **1**

Ферменти: 1- сахарозофосфорилаза (КФ, 2.7.1.211), 2- бета-фруктофуранозидаза (КФ, 3.2.1.26).; 3- глюкозо6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 4 – фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 5 – фруктозо-біфосфатальдолаза клас 2 (КФ4.1.2.13); 6 – тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 7 – фруктозо-1,6-

біфосфатаза клас 2 (КФ3.1.3.11); 8- глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9), глюкозо-6-фосфатепімераза (КФ 5.1.3.15); 9 – гексокіназа (КФ 2.7.1.1); 10 – альдозо-1-епімераза (КФ 5.1.3.3); 11- гліцеральдегід- 3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 12- фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 13 – 2.3 –біфосфатзалежна фосфогліцератмутаза (КФ5.4.2.11); 14 – енолаза (КФ 4.2.1.11)); 15- піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 16- лактатдегідрошеназа (КФ 1.1.1.27); 17- фруктокіназа (КФ 2.7.1.4).

4.2 Біосинтез біомаси *Bifidobacterium bifidum* 1

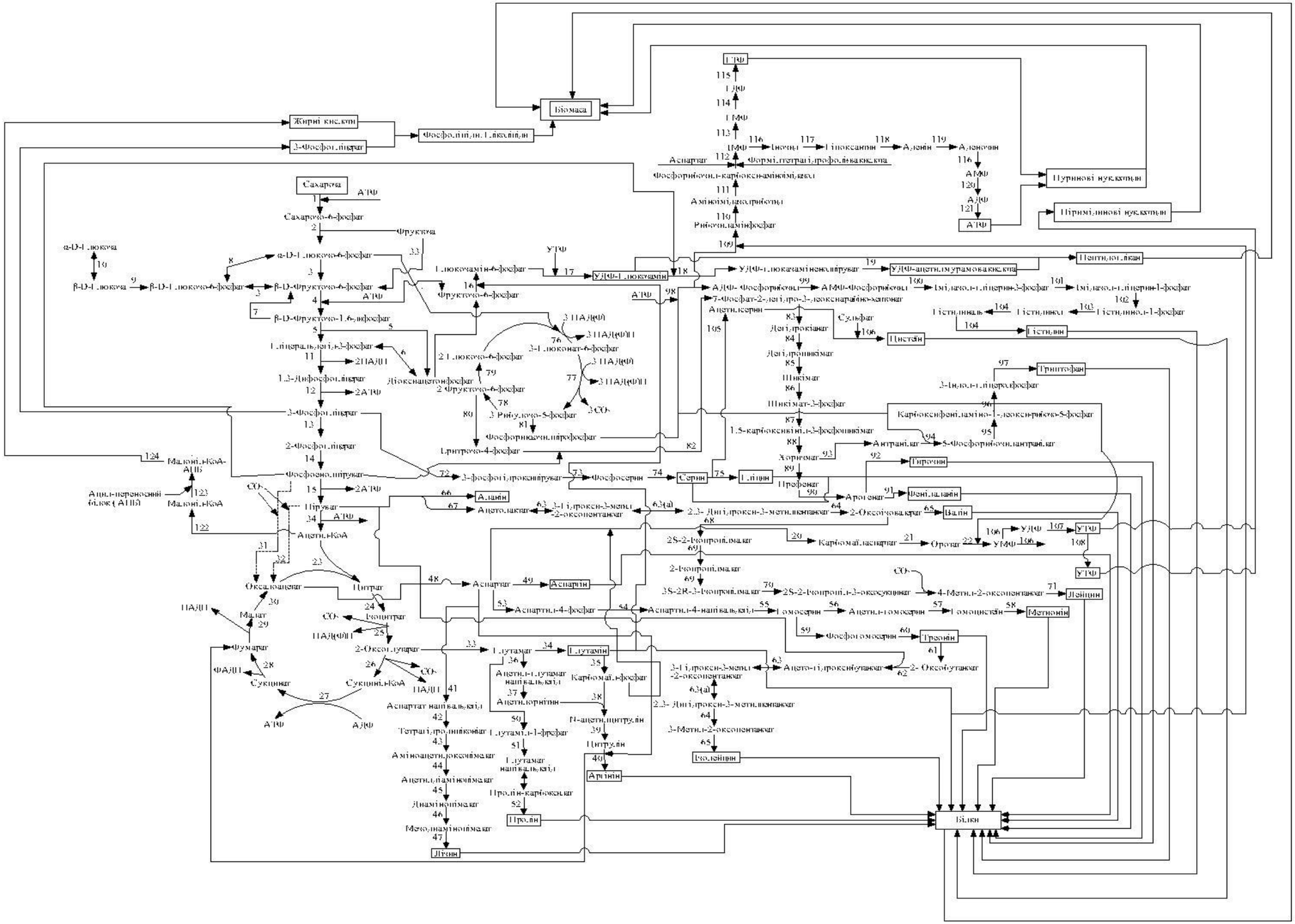
Під час росту *Bifidobacterium bifidum* 1 на середовищі з сахарозою як субстратом вона катаболізується до основних попередників синтезу амінокислот, жирних кисло, ліпідів та компонентів клітинної стінки. Половина попередників основних метаболітів для біосинтезу біомаси утворюється у ЦТК.

Також, невід`ємним джерелом потрібних інтермедіатів для біосинтезу останніх і ароматичних амінокислот є пентозофосфатний цикл. У якому утворюється еритрозо-4-фосфат і фосфорибозилпірофсфат.

Жирні кислоти утворюються полімеризацією ацетил-КоА через Ацил-переносний-білок (АПБ).

Особливісю даного продуцента є спецефічний для грампозитивних бактерій компонент клітинної стінки - пептидоглікан, що утворюється з ацетилглюкозамін і ацетилмурамова кислота, вони, як і інші попередники полісахаридів необхідних клітині утворюються з попередників біосинтез, що утворюються у глюконеогензі та пентозофосфатному циклі.

Схема перетворення глюкози на біомасу наведено на *рис.4.2.1*


Біомаса
Жирні кислоти
3-Фосфогліцерат
Фосфоліпіди, Гліколіпіди
Сахароза
АТФ
Сахароза-6-фосфат
Фруктоза
α-D-Глюкоза
β-D-Глюкоза
α-D-Глюкозо-6-фосфат
β-D-Глюкозо-6-фосфат
β-D-Фруктозо-6-фосфат
Фруктозо-6-фосфат
β-D-Фруктозо-1,6-дифосфат
Гліцеральдегід-3-фосфат
2НАДН
1,3-Дифосфогліцерат
2АТФ
3-Фосфогліцерат
2-Фосфогліцерат
Фосфоенолпіруват
2АТФ
Піруват
АТФ
Ацетил-КоА
Малоніл-КоА-АПБ
Ацил-переносний білок (АПБ)
Малоніл-КоА
CO2
Оксалоацетат
Цитрат
Ізоцитрат
НАДН
НАД(Ф)Н
CO2
2-Оксоглутарат
НАДН
CO2
Сукциніл-КоА
ФАДН
Сукцинат
Фумарат
Малат
НАДН
АТФ
АДФ
Діоксиацетонфосфат
2 Фруктозо-6-фосфат
3 Рибулозо-5-фосфат
3 НАД(Ф)Н
3 НАД(Ф)Н
3-Глюконат-6-фосфат
3 НАД(Ф)Н
3 CO2
2 Глюкозо-6-фосфат
Фосфорибозил-пірофосфат
Триптофан-4-фосфат
3-фосфогідроксипіруват
Фосфосерин
Серин
Цистеїн
Глутамат
Аспартат
Аспарагін
Аспартил-4-фосфат
Аспартил-4-напівальдегід
Гомосерин
Ацетил-гомосерин
Гомоцистеїн
Метіонін
Фосфогомосерин
Треонін
Ацетолактат
3-Гідроксі-3-метил-2-оксопентанат
2,3-Дигідроксі-3-метилпентанат
2-Оксобутанат
2S-2-Кетопролімалат
Карбоксиметаспартат
Оротат
УДФ
УМФ
УТФ
2S-2R-3-Кетопролімалат
2S-2-Кетопроліл-3-оксосукцинат
4-Метил-2-оксопентанат
Лейцин
3-Метил-2-оксопентанат
Валін
Ацетогідроксибутанат
Ізолейцин
Аспартат напівальдегід
Тетрагідродипіколінат
Аміноацетилоксоімідат
Ацетилдіамінімідат
Діамінопімідат
Мезодіамінопімідат
Лізин
Ацетил-глутамат напівальдегід
Ацетилорнітин
Глутамат-1-фосфат
Пролін-карбоксилат
Пролін
N-ацетилцитрулін
Цитрулін
Аргінін
Ацетил-глутамат
Карбомаїл-фосфат
Ацетилсерин
Сульфат
Дегідропіонат
Дегідропімідат
Шикімат
Шикімат-3-фосфат
1,5-карбоксивініл-3-фосфошикімат
Хоризмат
Антранілат
5-Фосфорибозилантранілат
Карбоксифеніламіно-1-дезокси-рибуло-5-фосфат
3-Індоліл-гліцерол-фосфат
Триптофан
Префенат
Ароген
Фенілаланін
Тирозин
Пентидоглікан
Тетрагідродипіколінат
Тетрагідродипіколінат-1-фосфат
Тетрагідродипіколінат
Тетрагідродипіколінат
Лізин
Цистеїн
Тетрагідродипіколінат
Пентидоглікан
Пентидоглікан
Ліпіди
Ліпіди
Ліпіди

Умовні позначення: Суцільна лінія- основний шлях метаболізму, штрихова- анаплеротичні реакції.

Фепменти: 1- глюкозокіназа (КФ2.7.1.2); 2- фосфофруктомутаза (КФ 5.4.2.2); 3- глюкозо6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 4 – фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 5 – фруктозо-біфосфатальдолаза клас 2 (КФ4.1.2.13); 6 – тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 7 – фруктозо-1,6-біфосфатаза клас 2 (КФ3.1.3.11); 8- глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9), глюкозо-6-фосфатепімераза (КФ 5.1.3.15); 9 – гексокіназа (КФ 2.7.1.1); 10 – альдозо-1-епімераза (КФ 5.1.3.3); 11- гліцеральдегід- 3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 12- фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 13 – 2.3 –біфосфатзалежна фосфогліцератмутаза (КФ5.4.2.11); 14 – енолаза (КФ 4.2.1.11)); 15- піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)[7]; 16- глутамінфруктозотрансаміназа (КФ2.6.1.16); 17 УТФ-ацетилглюкозаміндифосфорилаза (КФ2.6.1.16); 18- УДФ-ацетилглюкозамінкарюоксивінілтрансфераза(КФ 2.5.1.7); 19 – УДФ-ацетилмураматдегідрогеназа(КФ1.3.1.98.); 20- аспартаткарбомаїлтрансфераза (КФ 2.1.3.2); 21- дигідрооротаза (КФ 3.5.2.3), дигідрооротатдегідрогеназа (КФ 1.3.1.14); 22- оротатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.10), орнітинфосфатдекарбоксилазат (КФ 4.1.1.23); 23- цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 24 - аконітатгідратаза (КФ4.2.1.3); 25 - ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 26 - дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4); 27 - сукциніл-КоА синтетаза, альфа-субодиниця (КФ 6.2.1.5); 28 - сукцинатдегідрогеназа, цитохром b 556 субодиниця; 29 — фумаратгідратаза, клас II (КФ 4.2.1.2); 30 — малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 31 —фосфоенолпіруваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31); 32 - піруваткаробоксилаза (КФ 6.4.1.1) 33 – фруктокіназа (КФ 2.7.1.4).; 34 – піруватдегідрогеназа (КФ1.2.1.15); 35 –карбомаїл-фосфат синтаза (КФ 6.3.5.5); 36- ацетилглутаматсинтаза (КФ 2.3.1.1), ацетилглутаматкіназа (КФ 2.7.2.8), ацетил-гама-глутамінфосфатредуктаза (КФ 1.2.1.38); 37 – ацетил-орнітинамінотрансфераза (КФ 2.6.1.11) 38 – ацетил-орнітин-карбомал-трансфераза (КФ.2.1.3.9); 39- ацетил-орнітиндеацетилаза (КФ 3.5.1.16); 40- аргініно-сукцинатсинтаза (КФ 6.3.4.5), аргініно-сукцинатліаза (КФ 4.3.2.1);41 –

аспартаткіназа (КФ 2.7.2.4), аспартат-напівальдегіддегівдрогеназа (КФ 1.2.1.11); 42 - тетрагідродипіконіатсинтаза (КФ 4.3.3.7), дипіконіатредуктаза (КФ 1.17.1.8); 43 – ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.89), 44 – амінотрансфераза (КФ 2.6.1.-), 45 ацетилдіамінопімелатдиацетилаза (КФ 3.5.1.47); 46 – диамінопімелатепімераза (КФ 5.1.1.7); 47 – диамінопімелатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.20); 48 –аспартатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.1); 49 – аспаргінсинтаза (КФ 6.3.1.1); 50 – глутаматкіназа (КФ 2.7.2.11) 51 – глутамат-напівальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.41); 52 – пролін-карбоксилатредуктаза (КФ 1.5.1.2); 53 – аспартаткіназа (КФ 2.7.2.4); 54 – аспартат-напівальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.11); 55 – гомосериндегідрогеназа (КФ 1.1.1.3); 56 – гомосерин-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.31); 57 – ацетил-гомосеринліаза (КФ 2.5.1.49), цистеїн-гама-синтаза (КФ 2.5.1.48); 58 – гомосерин-метил-трансфераза (КФ 2.1.1.10), бетаїн-гомоцистеїн-метил-трансфераза (КФ 2.1.1.5), метіонінсинтаза кобаламін незалежна (КФ 2.1.1.14), метіонінсинтаза кобаламін залежна (КФ 2.1.1.13); 59 – гомосеринкіназа (КФ 2.7.1.39); 60 – треонінсинтаза (КФ 4.2.3.1); 61 – треоніндеаміназа (КФ 4.3.1.19); 62 – ацето-лактатсинтаза (КФ 2.2.1.6); 63(а) – кето-редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86), (в) 2-ацетолактатмутаза (КФ 5.4.99.3); 64 – дигідроксидегідратаза (КФ 4.2.1.9); 65 – трансаміназа В (КФ 2.6.1.42), лізиндегідрогеназа (КФ 1.4.1.9); 66 – аланіндегідрогеназа (КФ 1.4.1.1); 67 – ацетолактатсинтаза (велика субодиниця) (КФ 2.2.1.6); 68 – 2-ізопропілмалатсинтаза (КФ 2.3.3.13); 69 – ізопропілмалатдегідрогеназа (КФ 4.2.1.33); 70 – 3-ізопропілмалатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.85); 71- лейцинтрансфераза (КФ 2.6.1.6); 72-3-фосфогліцератдегідрогеназа (КФ 1.1.1.95); 73- фосфосеринамінотрансфераза (КФ 2.6.1.52); 74- фосфосеринфосфатаза (КФ 3.1.3.3); 75 – гліцингідроксиметилтрансфераза (КФ 2.1.2.1); 76- глюкозо-6-фосфатгідрогеназа (КФ1.1.1.49); 77 - глюконат-6-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.44) , фосфоглюконатдегідрогеназа декарбоксилювальна (КФ 1.1.1.343); 78 - трансальдолаза (КФ 2.2.1.1); 79 - глюкозо-6-фосфатізомереза (КФ 5.3.1.9); 80 - транскетолаза (КФ 2.2.1.1); 81-рибозофосфатпірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1); 82 -

3-дезокси-7-фосфоептулонат синтаза(КФ 2.5.1.54); 83 - дегідрокіанатсинтаза (КФ 4.2.3.4); 84 - 3-дегідрокіматдегідрогеназа (КФ 4.2.1.10) 85-шикіматдегідрогеназа (КФ 4.2.1.10); 86 - шикіматкіназа (КФ 2.7.1.71); 87- 3-фосфошикімат-1-карбоксивінілтрансфераза (КФ 2.5.1.19); 88 - хоризматсинтаза (КФ 2.5.1.19); 89 - хоризматмутаза (КФ 5.4.99.5); 90 - амінотрансфераза ароатична (КФ 2.6.1.57), аспартат-префенатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.78), глутамат-префенатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.79); 91 - префенатдегідрогеназа (КФ 4.2.1.51), 92-агрогенатдегідрогеназа (КФ 1.3.1.43), агрогенатдегідрогенада НАДФ$^{+}$ залежна (КФ 1.3.1.78), агрогенатдегідрогеназа НАД(Ф) + залежна (КФ 1.3.1.79); 93 – антранілатсинтаза (КФ 4.1.3.27); 94 – антранілатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.18); 95 – фосфорибозилантранілатізомераза (КФ 5.3.1.24); 96 – індол-3-гліцеролфосфатсинтаза (КФ 4.1.1.48); 97 – триптофансинтаза (КФ 4.2.1.20); 98 – АТФ-фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.17); 99- АТФ дифосфорибозилтрансфераза (КФ 3.6.1.31); 100- фосфорибозил-АМФ-циклогідролаза (КФ 3.5.4.19), імідазолкарбоксамідізомераза (КФ 5.3.1.16); 101 – імідазол-гліцеролфосфатдегідрогеназа (КФ 4.2.1.19); 102 – гістидинолфосфаттрансаміназа (КФ 2.6.1.9); 103 – гістидинолфосфатаза (КФ 3.1.3.15); 104- гістидинолдегідрогеназа (КФ1.1.1.23); 105 – серинацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.30); 106 – уридинкіназа (КФ 2.7.4.22); 107 – нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 108 – ЦТФ-синтаза (КФ 6.3.4.2); 109 – амінодифосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.14); 110 – фосфорибозиламінлігаза (КФ 6.3.4.13), фосфорибозилгліцинамідформілтрансфераза (КФ 2.1.2.2), фосфорибозилгліцинамідсинтаза (КФ 6.3.5.3), фосфорибозилгліцинамідлігаза (КФ 6.3.3.1), 111 – карбоксиламіно-імідазол –рибонуклеотидсинтаза (КФ 6.3.4.18), карбоксиламіно-імідазолрибонуклеотидсинтаза (КФ 5.4.99.18); 112 – імідазол-сукцинокарбоксиламідсинтаза (КФ 6.3.2.6), аденілосукцинатліаза (КФ 4.3.2.2), ІМФ- циклогідролаза (КФ 2.1.2.3), 113 – інозидмонофосфатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.205), ГМФ – синтаза (КФ 6.3.5.2); 114 – гунідинкіназа (КФ 2.7.4.8); 115-нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 116 – нуклеотидфосфоестераза (КФ

3.1.3.5); 117 – пуриннуклеозидфосфорилаза (КФ 2.4.2.1); 118 – аденін-діаміназа (КФ 3.5.4.2); 119 – пуриннуклеозидфосфорилаза DeoD тип (КФ 2.4.2.1); 120 – аденілаткіназа (КФ 2.7.4.3); 121 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40), нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 122- ацетил- КоА-карбоксилаза (КФ 6.3.4.14), біотинкарбоксилаза (КФ 6.4.1.2); 123 – маліл-переносний білок (трансилаза) (КФ 2.3.1.39); 124 – енол-АПБ- редуктаза (КФ 1.3.1.9)(FabI), енол-АПБ-редуктаза НАДН залежна (КФ 1.3.1.104)(FabL).

Схеми біотрансформації та катаболізму , керуючись якими була зроблена схема наведені у додатку 1.

РОЗДІЛ 5. Обгрунтування вибору технологічної схеми

5.1 Обгрунтування доферметаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обгрунтування способу культивування і типу ферментера

Біфідобактерії – облігатні анаероби, тож для культивування потребують повного виключення можливості потрапляння кисню в седеровище під час культивування, і хоча кисень не смертельний для них він все ж уповільнює їх ріст[15].

Досить розповсюдженим типом ферментерів є класичні(ферментери з перемішуючим пристроєм та барботером) тобто з комбінованим перенесенням енергії перемішування та класичною формою без спеціальних конструктивних елементів. Також є ферментери роллерного, ерліфтного типів а також анаеробні- без барботера, лише з перемішуючим пристроєм.

Обираємо ферментер останнього типу, оскільки він підходить лише для анаеробних умов культивування, яких і потребують біфідобактерії. Відсутність барботера створює повністю герметичні умови. Тож кисень ніяк не може потрапити у ферментер, до того ж пропонується продувати вільний простір ферментера перед культивуванням інертним газом ,аби витиснути повітря з киснем. Ферментери такого типу досить нечасто випускаються тож можлива заміна ферментера без барботера на барботажний ферментер проте замість повітря перший час буде пропускатися азот до певного значення тиску аби витиснути повітря з киснем. А потім вхід барботера герметизуватиметься[32, 33].

Заданий об`єм виробничого біореактора становить 500 оскільки пробіотичні препарати потребують небагато біомаси для виробництва тож відповідно і обєми виробництва мають бути невеликими. Біореактори місткістю до 500 л є дуже розповсюдженими, оскільки не займають багато місця, не потребують великої кількості матеріалів для виготовлення і здебільшого є серійними та іноді виготовляються на замовлення.

Такого об`єму ферментери виробляються майже всі компанії, які займаються виробництвом реакторів та ферментаційного обладнання[33,37]. Отже обрати даний тип реактора досить просто.

Обираємо ферментер об`ємом 500 л фірми «Solida Biotech» л. Обладнаний системою SIP/CIP, системою автоматизованого керування процесом, оглядовим ілюмінатором, та основними і додатковими датчиками для контролю процесу та портами введення компонентів[32].

Ферментер буде обладнаний турбінною мішалкою, оскільки вона забеспечує найкращий масообмін компонентів а оскільки барботажне пропускання кисню не використовується в даному випадку - це найоптимальніший варіант, до того є вона навіть на високих обертах не шкодить клітинам бактерій, котрими є продуцент, оскільки бактеріальні клітини стійкі до кутового зусилля мішалки[33]. Ферментер обладнано барботером проте не для аерації а для тимчасового пропускання інертного газу: аргону чиазоту для забеспечення відсутності кисню[33].

Система мийки CIP передбачає встановлення головок розпилення миючих розчинів всередині ферментера для кращого миття. Також ферментер обладнується основним набором датчиків для контролю процесу : pH-метр, вимірювач концентрації кисню та оптичної густини, барометри, датчик температури та датчик рівнів заповнення. До того ж додатково обладнується блоком насосів для подачі та дозування титруючих агентів та ємностей для них для підтримки pH та ємності для піногасника. Для контролю внутрішнього процесу візуально реактор обладнується ілюмінатором та освітлювачем. Також необхідно встановлення автоматизованої системи контролю процесу[33,34].

Режим культивування обираємо періодичний, оскільки кінцевий продукт-біомаса досягає максимальної концентрації у кінці експоненційної фази росту та на початку стаціонарної Для забезпечення стерильності пропускного інертного газу на вході у барботажну трубу фільтри індивідуальної очистки газу(фторопластові які витримують стерилізацію парою)[33].

Наводимо зображення ферментера (Рис 5.1.1)

*Рис.*5.1.1.1 **Зображення ферментера періодичної на 500 л[32]**

Температура культивування утримується на рівні 37 °С , оскільки продуцент є мезофілом оптимально росте і накопичує біомасу при даній температурі з найбільшим виходом. pH утримується на рівні 6.8-7.0 оскільки саме при цьому значенні pH спостерігаєтсья максимальний ріст[6].

Тривалість культивування проходить протягом 30-48 годин оскільки при такій тривалості культивування спостерігається максимальне накопичення біомаси до одержання 10^8 КУО/ мл даній технології культивування [6].

Для точної статистики процесу і визначення точного часу завершення процесу культивування з ферментера відбираються проби культуральної рідини для аналізу концентрації біомаси(КУО) та чистоти культури. Паралельно з цим з проб визначають вміст джерел азоту і вуглецю для більш точного опису процесу.

5.1.2 Обгрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Оскільки продуцент *Bifidobacterium bifidum* 1 є анаеробом підготовка повітря не має сенсу для аерації, однак необхідно підготувати інертний газ для підтримання якомога більшої відсутності кисню при культивуванні.

В ролі інертного газу, який подається у ферментер для виштовхування залишків повітря з ферментерів виступає азот. Його перед подачею у ферментер з балонів пропускають через фільтр з діаметром пор не більше 0,2 мкм аби забрати можливі контамінанти- мікроорганізми які можуть в ньому міститися[35].

5.1.3 Вибір мийних та дезінфікувальних засобів

5.1.3.1 Вибір мийних та дезінфікувальних засобів

Виробництво біомаси як компоненту пробіотичного препарату з використанням штаму *Bifidobacterium bifidum* 1 здійснюється упродовж 328 днів (див Розділ 1) інші ж дні будуть зайняті обслуговуванням обладнання та камонікацій з приміщенням. У примцщенні для виробничого біосинтезу будуть установлюватися ферментери на 100 та 10 л, автоклав на 20 л [18]. Також на карту кімнати додано реактори для стерилізації і замішування композицій поживного середовища. Реактор на 100 л та 2 реактори на 10 л. Тут враховано максимальну кількість реакторів для приготування композицій середовища для культивування і одержання посівного матеріалу.

Наводимо схему(*рис* 2.1) розміщення обладнання з відповідними габаритами для розрахування площі приміщення.

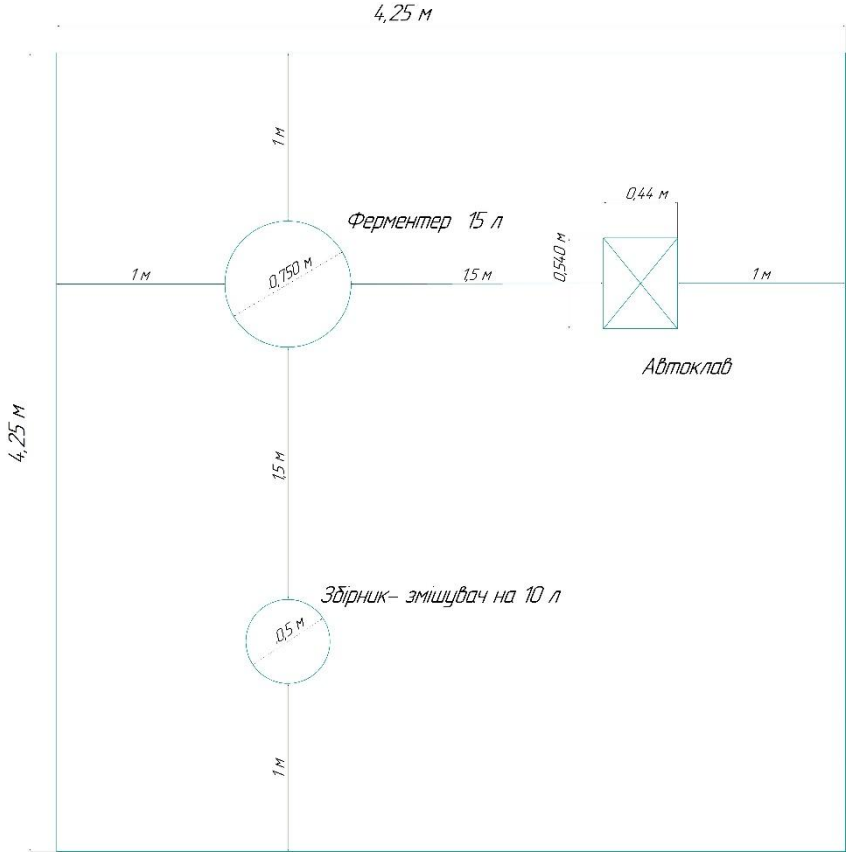


Рисунок 5.1.3.1 **Розміщення обладнання для біосинтезу**

У кімнаті встановлено ферментер на 100 л діаметром 1,57 м, ферментер на 10 л діаметром 1,1 м, також автоклав габаритами 0,64*0,46 м[17, 18]. Прийнято: встановлені реактори мають однакові габаритні діаметральні розміри як у 10 та 100 л відповідно.

Відстань між апаратами прийнято не менше 1 м(а саме 1 м) в середньому відстань до стін – 1 м. Апарати, які мають найбільшу висоту у 2.36 м[17] - ферментер виробничий на 100 л. Тому висоту кімнати приймаємо 4,5 м для врахування ситуацій мийки та розбору апаратів для їх ремонту.

Площа виробничого приміщення(на даній площі можна буде розмістити всю необхідну апаратуру буде становити 47,6 м^2(6,14*7,75). Висота стін приймаємо - 4.5 м. Загальна площа стін становитиме:

$$\big((4{,}5 \times 7{,}75) + (\,4{,}5 \times 6{,}14)\big) \times 2 = 125 \text{ м}^2.$$

Площа підлоги становить 47,6 м^2. Об`єми апаратури будуть становити : (100+ 100 + 10*3)/2 = 76,7, приймаємо 77 л.

Зіставимо *таблицю 5.1.3.1* в якій будуть вказані всі площі поверхонь, які треба мити чи дезінфікувати.

Таблиця 5.1.3.1

Розрахунок загальної площі миття та, чи дезінфекції оброблювального об`єкту за весь період виробництва пробіотика(біомаси)[35]

Об`єкт миття та / або дезінфекції	Площа(об`єм) оброблюваного об`єкту, $м^2$, л	Кількість процесів миття та , або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа(об`єм) миття за весь період виробництва, $м^2$(л)
Обладнання, інвентар, комунікації	77 л*	233	17941 л
Підлога	47,6	328	15612
Стіни, двері, вікна та підлога	125	11	1375

**Примітка 5.1.3.1* Приймаємо кількість генеральних прибирань 11 разів, щоденного 328, а миття обладнання 233 рази.

Оскільки приміщення для виробництва пробіотика буде за класифікацією GMP класу С, це означає, що буде встановлюватися система вентиляції повітря, та його фільтрації з відповідними фільтрами типу HEPA. У даному приміщенні концентрація зважених часток повинна бути не більше 0,5 мкм 350 000 та 5 мкм 2000. Клас здебільшого призначений для наступних операцій: приготування розчинів, коли ризик для якості продукції внаслідок контамінації майже виключений. Фасування продукції.

Вентиляційні системи встановлюють над обладнанням у вигляді дифузорів, а відведення повітря відбувається через нижні витяжні решітки.

Обгрунтування вибору мийних та дезинфікувальних засобів для виробничого біосинтезу біомаси *Bifidobacterium bifidum* 1

Щоб обрати дезинфікувальний чи миючий засіб, необхідно врахувати його вартість та витрати на оброблення потрібної площі виробничого приміщення. Середня витрати миючого чи дез. засобу становить 100 мл на 1 $м^2$ [35](згідно з

методичними рекомендаціями МОЗУ).Для порівняння миючих та дез. засобів наводимо *таблицю 5.1.3.2*

Таблиця 5.1.3.2.

Узагальнена характеристика деяких миючих та дезинфікувальних засобів , що можуть використовуватися у виробництві біомаси *Bifidobacterium bifidum* 1. [35-40]

Назва	**Спектр дії діючої речовини**	**Об`єкт миття чи дезінфекції**	**Концентрація робочого розчину %**	**Загальна площа чи об`єм миття за весь період виробництва $м^2$, (л)**	**Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л**	**Вартість 1 л, чи кг засобу, грн**	**Загальна вартість миття за період виробництва протягом року, грн**
Хлоратоїн	Бактрії	Стіни , підлога, вікна, двері, інвентар , тара	0,2	16987	1698,7	240	815,4
Каустична сода	Бактерії, гриби, дріжджі,	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	17941 л	17941 л	30	10764
Хлорне вапно	Бактерії, гриби, дріжджі, Спорові форми	Стіни, підлога, двері, вікна, комунікації	2,0	16987	1698,7	22	747,5
Кальцинована сода	Бактерії, гриби, дріжджі,	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	17941 л	17941 л	28,8	978,5
Біомой	Бактерії гриби	Обладнання комунікації, інвентар, тара	0,3	17941 л	17941 л	102	54624
Лизоформин 3000		Інвентар, комунікації, підлога, вікна, двері, стіни, обладнання	0,1	19639,7 л	19639,7 л	375	7364,88
Маносепт	Для миття рук персоналу	-	-	-	-	-	114

Продовження таблиці 5.1.3.2

Завершення таблиці 5.1.3.2

Blanidas Soft Des	Для миття рук персоналу						280
Вінсепт	Для миття рук персоналу						52
Деконтадез	Для миття рук персоналу						

Наводимо склад миючих засобів

Таблиця 5.1.3.3

Назва засобу	**Склад**
Хлоратоїн	%: дихлорантин - 20,0-22,0; 5,5-диметилгідантоїн - 12,0-16,0; натрій триполіфосфат- 9,0-10,0; аніонні поверхнево-активні речовини - 3,2-5,0; натрій бензоат - 0,0-10.0; наповнювач до 100.0.
Каустична сода	Каустична сода суха 95 %
Хлорне вапно	Суміш гіпохлориту кальцію, хлориду кальцію та гідроксиду кальцію у наступних співвідношеннях «25-25-50 %
Кальцинована сода	Карбонат натрія 96 %
Біомой	%: алкілбензолсульфонат натрію (сульфонол) 5,0-8,0; лужна протеаза 1,0-1,1 (діючі речовини); натрію карбонат; диспергатор; наповнювач.
Лизоформин 3000	9,5% глутарового альдегіда, 7,5% глиоксаля и 9,6% дидецилдиметиламмония хлорида
Маносепт	2-феноксіетанол (2%) і речовин ПАР.
Blanidas Soft Des	Триклозан -25% , ПАР – 20 % .інші вода.
Вінсепт	вода дистильвана, мЇякий ПАР,хлорід
Деконтадез	полігексаметиленбігуанід гідрохлорид, г дідецилдиметиламонію хлорид кокоглюкозид, гліцерилмоноолеат.

.

**Примітка 5.1.3.1.2* Засіб Маносепт та інші 3, що внизу таблиці для використання персоналом для миття рук. Для користування пропонується 2 засоби Маносепт та Blanidas soft des для використання персоналом для миття ру. Засоби змінюються кожен місяць на вибір.

Для забезпечення відповідної чистоти повітря обираємо періодичність ввімкнення бактерицидних ламп: 1 год після кожного генерального прибирання, та 40 хв після кожного робочого дня[35].

Проаналізувавши дані наведені у *табл* 5.1.3.2 , можна зробити наступні висновки:

- Для миття та дезінфекції обладнання, комунікацій, інвентарю, тари доцільно використовувати засіб «Біомой»
- Для миття та стін, підлоги, вікон, дверей є більш доцільним використання засобу хлоратоїн оскільки він один з найменш вартісних та достатньо ефективний[35].

Засіб «Біомой» через 1-2 місяці слід замінити на інший наприклад на лізоформін чи подібний по застосуванню засіб. Аби уникнути утворення дез-резистентних мікроорганізмів, проте упродовж першого пуску річної ферментації для біосинтезу[35].

Миття ферментерів : робочого та інокулятора , збірників, стерилізаторів відбувається вручну оскільки вони мають досить невеликі об`єми.

Приміщення виробниче за вимогами GMP буде відноситися до класу C-D, оскільки вимоги до чистоти повітря робочої зони є мінімальним, а також наявні локальні стерильні місця для засіву культур тож дані класи найбільше підходять.

5.1.3.2 Обгрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій. Стадія миття апаратури

Вся апаратура миється як зовні так і в середині. Зовні мийка проводиться протиранням зовнішніх частин деталей апаратури спеціальними серветками чи гумками змоченими дезинфікувально-мийними засобами. Внутрішня мийка ферментерів проводиться вручну розбірно. Даний тип мийки був обраний через, те, що він э більш зручним та потребує менше часу на підготовку а також , що мийка ведеться герметично, тож менше шансів занести у ферментер сторонню мікрофлору. Тому внутрішня частина апарата не повинна контактувати із зовнішнім середовищем тож мийка має бути закрита.

Внутрішня мийка допоміжної апаратури такої як автоклав та збірники проводиться вручну і розбірно, оскільки стерильність даної апаратури

необов`язкова через стерилізацію композицій і середовища культивування буде проводитись поза цими збірниками..

Після мийки апаратуру ополіскують 10 хвилин; також час ополіскування[35].

Стадія ТО(технічного огляду)

Технічний огляд апаратури проводять після миття та перед запуском процесу аби виявити наявність чи присутність дефектів у ній.

Перевірка на герметичність

Дана стадія стосується в першу чергу основного ферментера , інокулятора. Для цього у апарат на якому герметично затягнута вся арматура подається аераційне повітря до набору надлишкового тиску у 0,1-0,2-МПа, Перекривають прохід повітря, та фіксують показання манометра на протязі 40-60 хв. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа – апарат є герметичним. Якщо дане значення перепаду тиску перевищує 0,01 МПа проводять перевірку і знаходять місце розгерметизації із методом омилення апарата, оскільки ферментер є невеликого об`єму а цей метод є дуже простим і дешевим.

Апарат і місця з`єднань деталей апарата мильним розчином , для цього на ферментер та місця з`єднань наносять мильний розчин та чекають певний час, у місцях розгерметизації виникають невеликі бульбашки години, операція триває 30-40 хв. При знаходженні місця розгерметизації затягують з`єднальну арматуру. І повторюють операцію, якщо це не дало результатів то міняють прокладки з`єднань [35].

Стадія стерилізації обладнання та комунікацій

У даній технології культивування для підготовки апаратури та поживного середовища буде використана термічна стерилізація. Ферментер на 50 л стерилізуватиметься зсередини парою, а ферментер на 5 л буде стерилізуватися в автоклаві Стерилізація умовно поділена на 3 етапи.

Етап 1 Нагрів апарата: В сорочку подається глуха пара та апарат нагрівається до температури 80-90 ^{0}C.

Етап 2 Стерилізація(витримка) Відкривають усю запірну апаратуру, вентиль для відпрацьованого повітря і подають гостру пару в апарат через барботер чи через нижній спуск. Доводять до температури 140 ^{0}С, закривають усю запірну апаратуру та витримують відповідний час 40 - 30 хвилин

Етап 3 Охолодження. В апарат подають стерильне повітря та в рубашку подають холодну воду для охолодження. Процес проводять до температури 40 ^{0}С.

5.1.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний синтез біомаси *Bifidobacterium bifidum* 1 (1*10^8 КУО/ мл за 24 години) або розрахунково 4,055 г/л по біомасі досягається за умов росту на середовищі наступного складу, г/ л[6].

Соева сироватка -50

Пептон -1

Лактоза-1.0

Аскорбінова кис-0.5

Натрій лимоннокислий три заміщений – 6

Калій фосфорнокислий двозаміщний-2

Магній сірчанокислий-1,2

агар-агар-2,5

Згідно розрахунків Розділу 1, виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об`ємом 10 л, що містить 60 л культуральної рідини(поживне середовище і посівний матеріал). Одержання інокуляту(посівного матеріалу) відбувається у 2 етапи : у колбах на качалках, у інокуляторі на 10 л.

Приготування і стерилізація поживного середовища

На першому етапі для вирощування в колбах на качалці потрібно 300 мл поживного середовища (див Розділ 1). Тому для стерилізації компонентів обираємо автоклав горизонтальним заповненням на 20 л [40].

Компоненти такі як лактоза, , пептон, соєва витяжка та агар-агар будуть стерилізуватися в одній(окремій) колбі в автоклаві як:

Копозиція А при темературі 120 ^{0}С протягом 20 хв оскільки ці компоненти є термолабільними і потребують більш м`якого режиму стерилізації ніж неорганічні солі.

Композиція Б яку будуть складати лимонокислий натрій та калій фосфорнокислий, вони стерилізуватимуться в іншій колбі в цьому ж автоклаві але при 135 ^{0}С протягом 40 хв оскільки ці компоненти є термостабільними.

Композиція В . Дану композицію буде складати одна сіль – магній сірчанокислий, оскільки при сумісній стерилізації з композицією Б може утворюватися малорозчинна сполука. Стерилізація буде проходити за режимом 135 ^{0}С протягом 40 хв оскільки сіль теж є термостабільною.

Композиція Г. Аскорбінова кислота- дуже термолабільний компонент, буде стерилізуватися за допомогою мікрофільтрації. В даному випдку будемо використовувати фільтруючу-стерилізаціну вакуумну установку одноразого використання[26]. Діаметр пор 0,2 мкм.

Етап вирощування посівного матеріалу у інокуляторі на 10 л буде проводитися з приготуванням такої ж кількості композицій: **Композиція Г**, **Композиція Б** , **Композиція В** , **Композиція А** однак будуть відповідно збільшені ї об`єми і одна з композицій, а саме Композиція а буде стерилізуватися у збірнику на 10 л. кількість середовища та посівного матеріалу буде відповідно 6,6 л. Режими стерилізації будуть такими же як і у попередньому етапі.

Етап виробничого біосинтезу у ферментері місткістю 100 л потребує 60 л поживного середовища. Дане середовища буде готуватися по наступним композиціям:

Копозиція А: соєва витяжка, пептон, лактоза, ага-агар при температурі 120 ^{0}С протягом 20 хв оскільки ці компоненти є термолабільними і потребують більш м`якого режиму стерилізації[35].

Композиція Б лимоннокислий натрій та калій фосфорнокислий, сірчанокислий магній, 135 ^{0}С протягом 40 хв стерилізується композиція при

зниженні pH до 4,0 для усунення можливості реагування фосфатів з сульфатами та утворення нерозчинних солей[35].

Композиція В Аскорбінова кислота, буде стерилізуватися за допомогою мікрофільтрації. В даному випдку будемо використовувати фільтруючу-стерилізаціну вакуумну установку одноразого використання[42]. Діаметр пор 0,2 мкм[35].

5.2 Обгрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.

5.2.1 Відділення біомаси від культуральної рідини

Для відділення супернатанту від біомаси яка необхідна при подальших процесах одержання ліофілізату, існує багато способів і апаратів. Одними з найбільш розповсюджених способів є сепарація, центрифугування, ультрафільтрація[34].

Центрифугування. Даний спосіб дуже ефективний для відділення біомаси клітин бактерій та дріжджів, або інших одноклітинних організмів, оскільки для реалізації цього способу суспензійна культура піддається великому навантаженню відцентрової сили, при якому відділяються тверді часточки від рідини. В залежності від процесу центрифуги поділяються на проточні, фільтраційні та декантантні[43].

Фільтраційні центрифуги призначені для відділення твердих часточок та розділення таким чином суспензій на водну фазу та концентрований твердий фугат(рис 5.2.1)

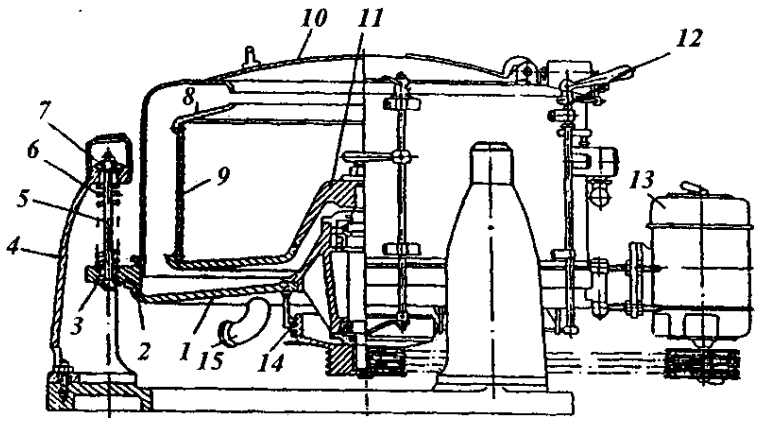


Рисунок 5.2.1.1. **Фільтраційна центрифуга**.

1 - корпус; 2 - приливи; 3,7 - сферичні головки; 4 - колона;

5 - підвіс; 6 -пружина; 8 - барабан; 9 - фільтрувальна поверхня; 10 - кришка; 11 -ступиця барабана; 12 - рукоятка механізму гальмування; 13 -електродвигун; 14 - гальмо;15 - патрубок.

Основна перевага такої конструкції центрифуги це високий фактор розділення та маленькі втрати твердої фази при розділенні. Недолік , як і усіх центрифуг вертикальної будови є низька продуктивність процесу[44].

Проточна центрифуга на відміну від фільтраційної володіє найменшими габаритами та найвищою продуктивністю(рис 1.2), яка забезпечується принципом дії, коли рідина-суспензія розділяється в протоці по ходу руху рідини через неї, однак даний тип центрифуг володіє дещо меншим фактором розділення і до того ж має найбільш високу вартість у порівнянні з попередньою. Оскільки вона є ефективною для великотонажних об`ємів продукту, її використання для невелики кількостей, наприклад для відділення біомаси пробіотичних штамів у кількості до 100 л культуральної рідини за цикл не є рентабельним[45].

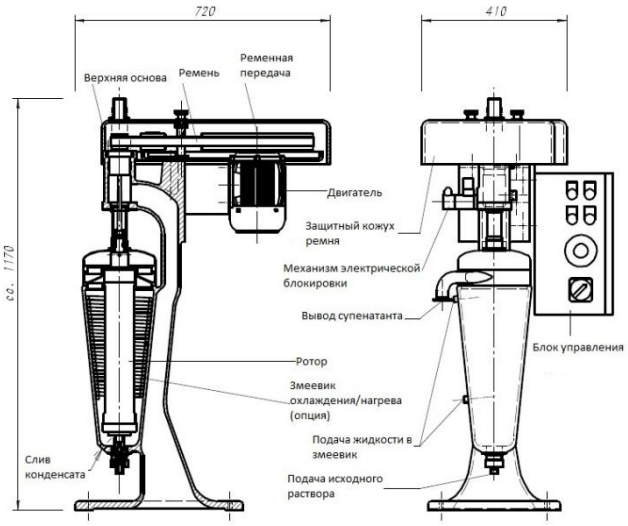


Рисунок 5.2.1.2 **Проточна центрифуга[45]..**

Горизонтальна (декантантна) центрифуга (рис 5.2.3) характеризується великими габаритами та високою продуктивністю, однак має вкрай низький фактор розділення і застосовується для розділення суспензій з часточками не

менше 10-20 мкм , а оскільки клітини бактерій у десятки разів менші застосування такої центрифуги є невигідним через високу собівартість і великі втрати біомаси під час розділення спричинені низьким фактором розділення.

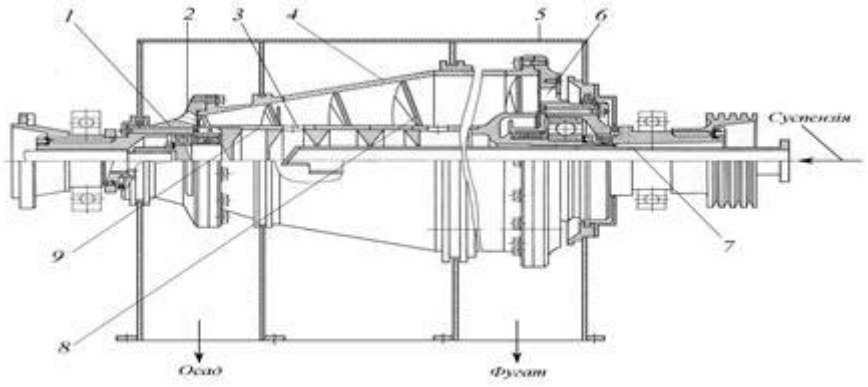


Рис 5.2.1.3. Декантантна

Центрифуга неперервної дії зі шнековим вивантаженням осаду: 1-цапфа; 2, 3, 6 - отвори; 4- ротор; 5- кожух; 7- труба для подачі суспензії; 8- шнек; 9- циліндрична основа шнека

Метод розділення під назвою сепарація виконуєтсья на відповідних установках- сепараторах , апарати схожі за будовою на центрифуги однак з додатковими констуктивними деталями- тарілками, які збільшують фактор розділення і підвищують продуктивність процесу[46].

Сепаратори (рис 5.2.4) зазвичай містять 20-50 тарілок, що дозволяє розділити суспензії з розміром часточок до 3-5 мкм. Однак сепаратори володіють однією особливістю, яка призводить до великих втрат біомаси мікроорганізмів при її відділення або часточок суспензії, якщо вони менше 3-5 мкм оскільки фактор розділення сепаратора недостатній для ефективного відділення таких часточок, що збільшує кількість води(дисперсійного середовища) у твердій (важкій фазі) відділеній сепаратором, до того ж сепаратор має дуже високу продуктивність, що непотрібно при малотонажних виробництвах, як у нашому випадку[47].

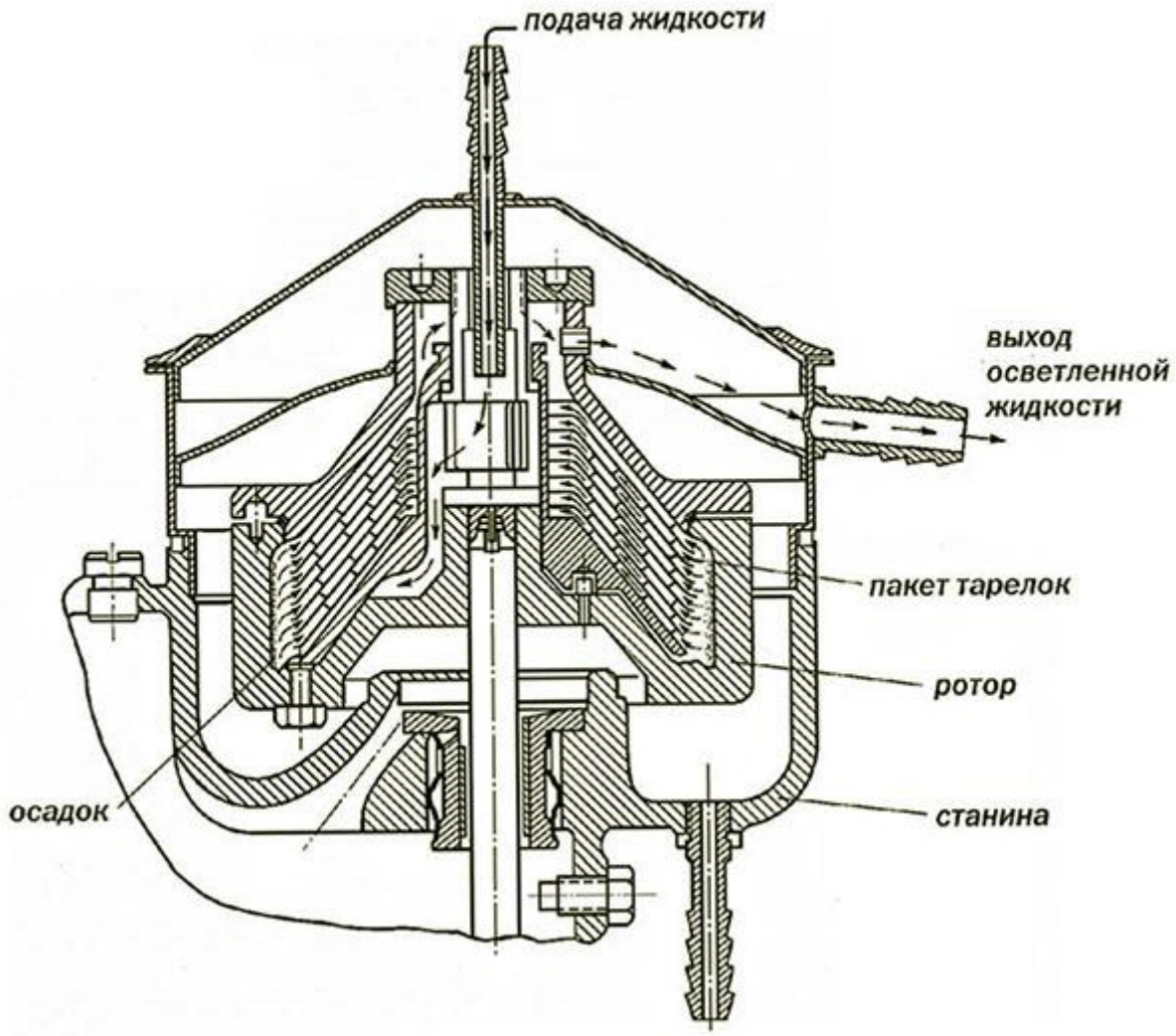


Рис.5.2.1.4 . Будова сепаратора [47]

Ультра-фільтраційна установка (рис 1.5) представляє собою комплексну установку, в яку входять насоси та фільтри з певним діаметром пор. Діаметр пор можна підібрати таким чином, щоб розділення біомаси і рідини становила до 95 - 99 % , що зменшить втрати до мінімуму, однак при використанні ультрафільтраціної установки при відділенні біомаси необхідно буде постійно міняти фільр-картриджи та обслуговувати насоси, оскільки швидкість фільтрування буде вкрай низька і насоси потребуватимуть періодичної чистки. Тому даний тип відділення біомаси не підходить[48].

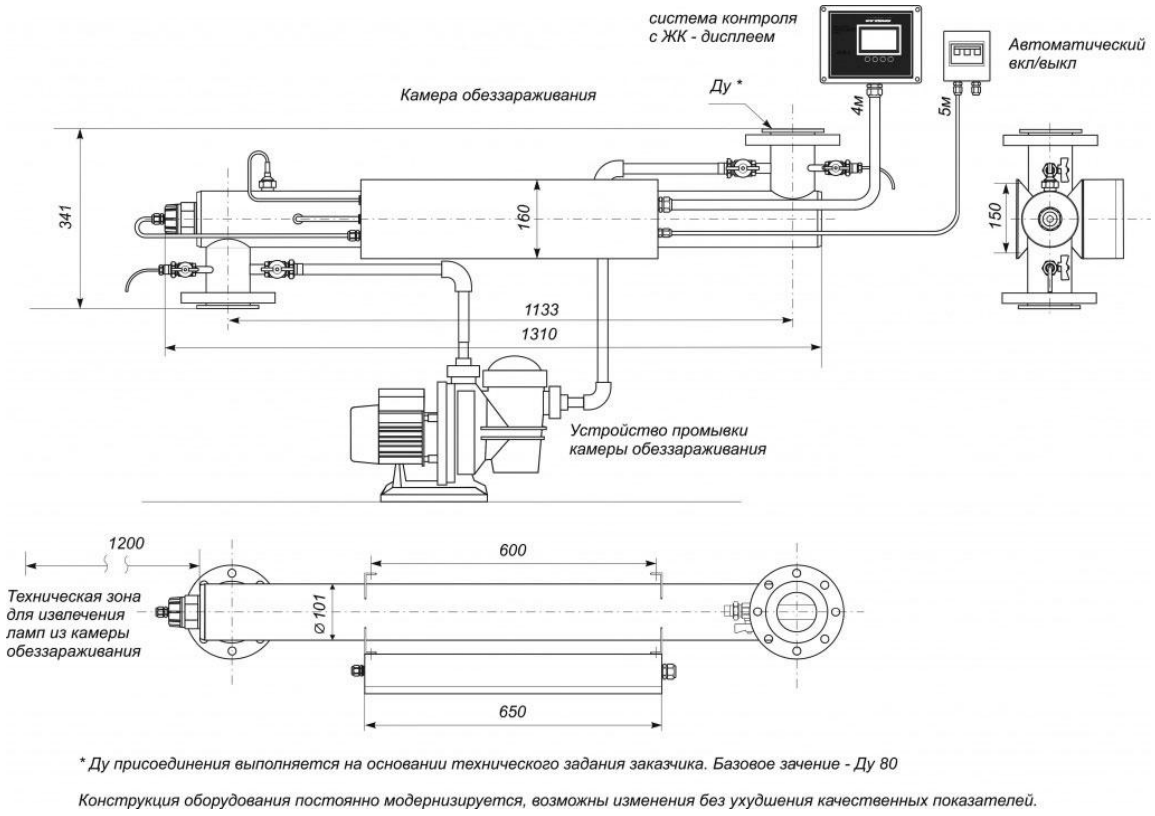


Рис.5.2.1.5 Ультрафільтраційна установка[48]

Обираємо для відділення біомаси біфідобактерій від культуральної рідини центрифугування за допомогою фільтраційної центрифуги оскільки даний тип установки володіє наступними перевагами:

- Невелика продуктивність

-Високий фактор розділення

-Низькі втрати

Центрифуга має дуже високий критерій Фруда, що характеризує високу ефективність розділення біомаси, особливо це важливо для клітин які мають розміри менше 0,4 мкм у конкретному випадку бактеріальні клітини мають розмір 0,2 мкм тож цетрифуга буде ефективною, також при малих кількостях продукту важливо зберегти найнижчі втрати при виділенні, і з цим центрифуга справляється повністю. При цьому втрати найбільш мінімальні.

5.2.2 Змішування біомаси з захисним середовищем

При подальшій ліофілізації або висушування біомаси для виготовлення концентрату біомаси необхідно захистити клітини від температурних змін та змін

агрегатного стану рідин, які знаходяться у клітини, щоб мінімізувати загибель клітин та максимізувати кількість живих клітин у концентраті біомаси. Для збереження життєздатності клітин використовують наступні протекторні речовини: полісахариди, полігамаглутамінову (написать про них , почему не они) кислоту, желатин, гліцерин, ДМСО.

Таблиця 5.2.2.1

Назва	**Опис**	**Література**
Полісахариди	Високомодекулярні сполики, які володіють здатністю кріопротекції клітин, завдяки утворенню захисного шару навколо клітини однак не потрапляють усередину клітини. Мають низьку вартість	[49]
Гліцерин	Низькомолекуряний спирт, може без проблем споживатися клітиною та проникати всередину , при високих концентраціях проникаючи в клітину та знаходячись у суспензії клітин має кріопротекторну властивість. Має низьку вартість.	[50].
Полігамаглутамінова кислота	Полімер глутамінової кислоти, кріопротектор в клітину може проникати лише при наявності специфічних ферментів гідролаз у клітин продуцента біомаси .Досить дорога та малодотупна.	[51].

Продовження таблиці 5.2.2.1

Завершення таблиці 5.2.2.1

Желатин	Полімер- білок. Збльшує густину розчинів та утворює захисну плівку навколо клітин при концентруванні та проявляє кріопротекторні властивості, проте легко руйнується, нестабільний та можу споживатися продуцентами.	[52].
ДМСО	Диметилсульфоксид, низькомодекулярна речовина, що легко проника в клітину та може зменшувати температуру замерзання води всередині клітин таким чином чинить кріопротекторну дію, однак при високих концентраціях може руйнувати цитоплазматичні мембрани клітин, що зменшує кількість живих клітин.	[53].

Порівняно з гліцерином відповідними характеристиками володіє ДМСО (диметилсульфоксид) однак він більш дороговартісний та менш стабільний.

Обираємо як основний захисний компонент гліцерин, оскільки він володіє такими характеристиками: легкодоступний, має низьку вартість, гарно проникний на відміну від полімерних речовин(полісахаридів та інш). Захисне середовище окрім захисного компоненту містить ряд інших , наприклад для

молочно кислих бактерій у захисне середовище вносять молоко та деякі олігосахариди чи манітол.

Таблиця 5.2.2.2

Захисні середовища (%)	**Література**
Середовище для молочнокислих бактерій 1 : желатин-1, молоко знежирене- 20, натрій оцтовокислий-39, сорбітол- 40	[54,55].
Середовище для молочнокислих бактерій 1 : желатин-0,5 молоко знежирене- 35,5 натрій оцтовокислий-20 цукор – 20 лактоза-10 мальтоза-10	[54,55].
Середовище модифіковане : гліцерин-5 , сорбітол- 40, натрій оцтовокислий -20, молоко знежирене- 35	[54,55].

Обираємо наступний склад захисного середовища для біфідобактерій (%): желатин-1, молоко знежирене- 20, натрій оцтовокислий-39, сорбітол- 40. Дане середовище універсальне для всіх типів молочнокислих бактерій зокрема для бііфідобактерій, адже основна задача даного середовища: забезпечити мінімальний негативний вплив на клітини при заморожуванні та створити сприятиливі умови для відновлення клітин при потраплянні у шлунково-

кишковий тракт. У даному середовищі присутній желатин, як один із захисних компонентів, однак його можна змінити на гліцерин, який має меншу вартість та менше піддається псуванню та розкладу. Середовище буде мати наступний склад: гліцерин- 5 %, сорбітол- 40%, натрій оцтовокислий -20%, молоко знежирене- 35%, оскільки гліцерин у складі на відміну від желатину більш стабільний, та менш вартісний тим паче не розкладається при довготривалому зберіганні[54,55].

Звертаючи увагу на останні дослідження впливу гліцерину на організм людини було доведено, що гліцерин має негативні ефекти на організм людини, зокрема поглинає воду та забирає вологу у поверхневих шарах епітелію, однак оскільки кількість гліцерину, що буде прийматися людиною у складі препарату на основі ліофілізованої біомаси біфідобакерій у захисному середовищі з гліцерином досить низька (близько 2,5 %) та з врахуванням кількості прийнятого препарату за курс вплив гліцерину буде мінімальним, що не сприятиме проявленню його негативних ефектів.

5.3. Висушування / ліофілізація

Для переведення біомаси в суху форму необхідно висушити біомасу. Так як клітина продуцента при звичайних умовах нездатна витримати висушування необхідно створити такі умови. Основні підходи до вирішення цієї проблеми є вакуумне висушування та ліофілізація. Ліофілізація представляє собою вакуумне висушування з замороженого стану з додаванням кріопротектора, вакуумне висушування- висушування під вакуумом при температурах до 50 ^{0}C для живих клітин. К процес переведення біомаси у тверду форму з довгим терміном зберігання обираємо ліофілізацію оскільки даний спосіб зберігає найбільше живих КУО та створює властивості біомаси, які дозволяють зберігати її протягом десятків років[56,57].

РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання

За розрахунками у розділі ТЕО, потреба у пробіотичній біомасі становить 43 кг на рік, продуктивність штаму *Bifidobacterium bifidum* 1 становить 4,055 г/л сухої біомаси Таку кількість біомаси необхідно за виготовити за $T_{рд=}$ 328 днів. Згідно з даними, максимальне накопичення досягається при культивуванні штаму *Bifidobacterium bifidum* 1 на середовищі наступного складу(г/л):

C_1-Соєва витяжка – 50;

C_2- Пептон – 1;

C_3- Лактоза – 1;

C_4- Агар-агар-2,5;

C_5-Натрій лимонокислий– 6;

C_6-K_2HPO_4- 2;

C_7-$MgSO_4*7H_2O$- 1,2;

C_8-Аскорбінова кислота- 0,5;

Всього $C_{\sum п}$ = 64,2 г/л.

Для вирощування посівного матеріалу використовують середовище наступного складу (г/л):

C_1-Соєва..витяжка – 50;

C_2- Пептон – 1;

C_3- Лактоза – 1;

C_4- Агар-агар-2,5;

C_5-Натрій...лимонокислий– 6;

C_6-K_2HPO_4- 2;

C_7-$MgSO_4*7H_2O$- 1,2;

C_8-Аскорбінова..кислота- 0,5;

Всього $C_{\sum п}$ = 64,2 г/л.

Для подальших розрахунків приймаємо наступні показники:

- час роботи ферментера $T_{цф}$ = 34 год (мийка та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація апарату (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища(1,5 год),засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год) та ферментація (24 год).

-K_1=1,2 – коефіцієнт запасу часу, що враховує можливість нестерильних операцій;

- Сумарні втрати продукту при виробництві $E_{св}$ = 0,16;

- Коефіцієнт заповнення ферментера $K_ф$=0,64;

- Коефіцієнт заповнення посівного апарата $K_{пп}$ = 0,6;

- Коефіцієнт заповнення колб $K_{кол}$ = 0,2;

- Коефіцієнт заповнення збірника $K_{зб}$ = 0,9;

6.1. Розрахунок кількості виробничих циклів

Для забеспечення потреби у 43 кг на рік. Продуктивність продуцента становить($P_{кр}$): 4,055 г/л біомаси(0,0040 кг/л). Приймаємо вологість сухої біомаси 4 %, відповідно абсолютно сухої її буде $СР_{біом}$ =96%.

1)Розраховуємо яку кількість сухої біомаси можна отримати за добу, враховуючи кількість трудоднів ($V_{тдн}$ = 328).

$$А_{нтд} = А_{нт} / Т_{тдн} = 43 / 328 = 0,131 \text{ кг / добу}$$

2) Кількість продукту за цикл буде становити:

$$А_{цикл}=(А_{нтд} \times Т_{цф})/24 = (0,131 \times 34)/24 = 0,185 \text{ кг /цикл}$$

3) Об`єм культуральної рідини, у якій можна отримати дану кількість біомаси(кг) за цикл з урахуванням втрат($E_{св}$ =18%) буде станвити:

$V_{kp} = (К_1 \times А_{цикл} \times СР_{біом})/(1 - Е_{св}) \times Р_{кр} = (1.1 \times 0,185 \times 0,96)/(1 - 0,18) \times 0,0040 = 59,56 = 60$ л/цикл

Кількість циклів ферментації буде становити:

4) $N_{цикл} = A_{нд}/ A_{цикл} = 43 /0,185 = 232,4 = 233$ циклів

$T_{цф}$ – цикл роботи ферментера(34 год), що включає час біосинтезу(24 год), та час підготовки ферментера- 10 год, K_1 –коефіцієнт запасу, що враховує ймовірність нестерильних операцій. Підготовка ферментатора включає: миття та огляд-2 год, перевірка на герметичність-2 год, стерилізація – 2 год, охолодження – 1 год, завантаження середовища – 1,5 год, засів- 0,5 год, відвантаження культуральної рідини- 1 год.

120 л культуральної рідини можна отримати у реакторі геометричний об`єм якого має становити(приймаємо коефіцієнт заповнення 0.65):

$$V_р= V_{кр}/ K_{зап} = 60/0,60 = 100 л$$

Найближчий об`єм ферментера =100 л (обираємо ферментер компанії , BIOSTAT® D-DCU на 100 л [17]. Перераховуємо $K_{зап.}$

$K_з= V_{кр}/V_р = 60/100 = 0,6$, що не перевищує заданого значення.

**Примітка 1.3.1* Кількість виробничих трудоднів взято 328 , на рік , решта трудоднів буде розподілена на можливе технічне обслуговування апаратури.

.

6.2 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу біомаси штам *Bifidobacterium bifidum* 1

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 60$ л культуральної рідини. Враховуючи втрати культуральної рідини в результаті краплевиносу через колектор $E_ф$ (10-15 %).приймаємо втрати 10 %

Отже кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб} 1= V_{кр}/ (1-E_ф) = 60/(1-0,1)= 66,7 л$$

Можливий геометричний об`єм буде становити:

$$V_Ф= V_{роб}1/ K_{зап} = 66,7/ 0,6 = 111,2 л$$

Приймаємо найближчий стандартний об`єм ферментера – 100 л(ферментер BIOSTAT D-DCU [17].

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$К_{зап}$ = 66,7/ 100 = 0,66 поправляємо взятий раніше коефіцієнт заповнення.

Кількість поживного середовища в ферментері з поправкою на інокулят у 10%($Х_ф$) буде становити:

$$V_{пс1}= V_{роб}1/ (1+Х_ф) = 66,7/(1+0,1) = 60,6 л$$

Звідси кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1}= V_{роб}1- V_{пс1} = 66,7-60,6 = 6,1 л$$

6.3. Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу

6.3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

За виробничий цикл отримують $V_{кр}$ = 60 л культуральної рідини. Враховуючи втрати культуральної рідини в результаті краплевиносу через колектор $Е_ф$ (10-15 %).приймаємо втрати 10 %

Отже кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб} 1= V_{кр}/ (1-Е_ф) = 60/(1-0,1)= 66,7 л$$

Можливий геометричний об`єм буде становити:

$$V_Ф= V_{роб}1/ К_{зап} = 66,7/ 0,6 = 111,2 л$$

Приймаємо найближчий стандартний об`єм ферментера – 100 л(ферментер BIOSTAT D-DCU [17].

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$К_{зап}$ = 66,7/ 100 = 0,66 поправляємо взятий раніше коефіцієнт заповнення.

Кількість поживного середовища в ферментері з поправкою на інокулят у 10%($Х_ф$) буде становити:

$$V_{пс1}= V_{роб}1/ (1+Х_ф) = 66,7/(1+0,1) = 60,6 л$$

Звідси кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1}= V_{роб}1- V_{пс1} = 66,7-60,6 = 6,1 л$$

6.3.2. Кількість стадій вирощування посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{кр}$ = 60 л культуральної рідини. Оскільки для засіву виробничого біореактора необхідно 6,1 л посівного матеріалу продовжуємо розрахунок.

Для одержання 6 л посівного матеріалу в посівному апараті вираховуємо втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Приймаємо це за 10%

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

$V_{роб}2= V_{пм1}/ (1-E_{па}) = 6/(1-0,1)= 6,7$ л

Кількість поживного середовища з поправкою на інокулят у 10%($X_ф$) буде становити:

$V_{пс}2= V_{роб}2/ (1+X_{ПА}) = 6,7/(1+0,1) = 6,1$ л

Звідси кількість посівного матеріалу становить:

$V_{пм2}= V_{роб}2- V_{пс2} = 6,7-6,1 = 0,6$ л = 600 мл

Таку кількість посівного матеріалу можна отримати у колбах на качалках об`ємом 750 мл з коефіцієнтом заповнення 0.2

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу буде становити:

$N = V_{пм}2/ (V_{колб}*К_{зк}) = 600/(750*0.2) = 4$ штуки.

Отже процес одержання біомаси штам *Bifidobacterium bifidum* 1, буде складатися з трьох стадій і кінцева виробнича стадія буде проводитися у ферментері об`ємом 100 л з коефіцієнтом заповнення 0,66.

6.3.3. Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для виробничого ферментера

Відповідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу, загальні витрати компонентів на визначений об’єм поживного середовища ($V_{псф}$) складуть :

$G_ф=V_{псф}\times C_{\sum ф}= 66,7\times 64,2 =4282$ г , в тому числі :

Соєва витяжка– $G_1 = G_ф\times C_1/C_{\sum ф} = 4282 \times 50/64,2 = 3335$;

Пептон– $G_2=G_ф\times C_2/ C_{\sum ф} =4282 \times 1/64,2 = 66,7$;

Лактоза– $G_3 = G_ф \times C_3 / C_{\sum ф} = 4282 \times 1 / 64,2 = 66,7$;

Агар-агар – $G_4 = G_ф \times C_4 / C_{\sum ф} = 4282 \times 2,5/64,2 = 166,75$;

Лимонокислий натрій– $G_5 = G_ф \times C_5 / C_{\sum ф} = 4282 \times 6/64,2 = 400,2$;

K_2HPO_4 – $G_6 = G_ф \times C_5 / C_{\sum ф} = 4282 \times 2/64,2 = 133,4$;

$MgSO_4*7H_2O$ – $G_6 = G_ф \times C_5 / C_{\sum ф} = 4282 \times 1,2/64,2 = 80$;

Аскорбінова кислота – $G_6 = G_ф \times C_5 / C_{\sum ф} = 4282 \times 0.5/64,2 = 33,35$;

6.3.4. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого ферментера на 100 л

Оскільки об'єм поживного середовища у ферментері складає $V_{псф} = 60,6$ л, кількість конденсату становитиме $V_{фк} = 60,6 \times 0,1 = 6,06$ л.

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде :

$V_{вф} = V_{псф} - G_ф - V_{фк} = 60,6 - 4,282 - 6,06 = 50,258$ л

Формуємо композицій

Таблиця 6.3.4.

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для ферментера

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/ л	Вміст компонента в 66,7 л середовища ,г (л)	Композиція	Об'єм композиції , л
1	2	3	4	5
Соєва витяжка	50	3335	А	33,63
Пептон	1	66,7		
Лактоза	1	66,7		
Агар-агар	2,5	166,75		
Вода	-	30		
Конденсат, 10 %	-	3,636		
Лимонокислий натрій	6	400,2	Б	20,61
K_2HPO_4	2	133,4		
$MgSO_4*7H_2O$	1,2	80		

Продовження таблиці 6.3.4

Завершення таблиці 6.3.4

Вода	-	20		
Конденсат 10%	-	2,424		
Аскорбінова кислота	0.5	33,35	В	0,291
Вода	-	0.258		
Конденсат 10%	-	0		
Сума ∑	64,2	60,6		60,6

Композицію Б стерилізують при пониженому pH 4.0 задля запобігання утворення нерозчинних осадів.

6.3.5 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 10 л

З розрахунку вище стадій підготовки ПМ необхідна кількість посінрго матеріалу яку отримують з інокулятора – 6,1 л, звідси кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить :

$$V_i = \frac{Vi}{1-Епа} = \frac{6,1}{1-0,1} = 6,7 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища у інокуляторі становитиме:

$$V_{псі} = \frac{Vi}{1+Хпа} = \frac{6,7}{1+0,1} = 6,1 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву:

$$V_{пмі} = V_i - V_{псі} = 6,7 - 6,1 = 0.6 \text{ л.}$$

Згідно зі прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні втрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{псі}$ складають :

$G_ф = V_{псф} \times C_{∑ф} = 6,7 \times 64,2 = 430$ г , в тому числі :

Соєва витяжка– $G_1 = G_ф \times C_1 / C_{∑ф} = 430 \times 50/64,2 = 335$;

Пептон– $G_2 = G_ф \times C_2 / C_{∑ф} = 430 \times 1/64,2 = 6,72$;

Лактоза– $G_3 = G_ф \times C_3 / C_{∑ф} = 430 \times 1/64,2 = 6,72$;

Агар-агар – $G_4 = G_ф \times C_4 / C_{∑ф} = 430 \times 2,5/64,2 = 16,8$;

Лимонокислий натрій– $G_5 = G_ф \times C_5 / C_{∑ф} = 430 \times 6/64,2 = 40,3$;

K_2HPO_4 – $G_6 = G_ф \times C_5 / C_{∑ф} = 430 \times 2/64,2 = 13,44$;

$MgSO_4*7H_2O – G_6 = G_ф \times C_5 / C_{\sum ф} = 430 \times 1,2/64,2 = 8.06$;

Аскорбінова кислота – $G_6 = G_ф \times C_5 / C_{\sum ф} = 4282 \times 0.5/64,2 = 3,36$;

6.3.6. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для інокулятору

Оскільки об'єм поживного середовища у інокуляторі складає $V_{псі}$= 6,1 л, конденсат не буде утворюватися, оскільки при стерилізації в автоклаві він не утворюється. Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде :

$V_{ві}=V_{псі}-G_і-V_{ік}=6,1 – 0,430 = = 5,67$ л

*Примітка 3.1 Конденсат при стерилізації поживного середовища не утворюється оскільки даний малий об`єм буде готуватися та стерилізуватися в колбах в автоклаві.

Формуємо композиції

Таблиця 6.3.6.

Склад композицій для стерилізації поживного середовища в інокуляторі на 10 л

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/ л	Вміст компонента в 6,7 л середовища ,г (л)	Композиція	Об'єм композиції , л
1	2	3	4	5
Соєва витяжка	50	335	А	2,865
Пептон	1	6,72		
Лактоза	1	6,72		
Агар-агар	2,5	16,8		
Вода	-	2,5		
Конденсат, 10 %	-	-		
Лимонокислий натрій	6	40,3	Б	2,562
K_2HPO_4	2	13,44		
$MgSO_4*7H_2O$	1,2	8,06		
Вода	-	2,5		
Конденсат 10%	-	-		
Аскорбінова кислота	0.5	3,36	В	0,673

Продовження таблиці 6.3.6

Завершення таблиці 6.3.6

Вода	-	0.670		
Конденсат 10%	-	-		
Сума ∑	64,2	0.6		0,6

Композиції А і Б будуть стерилізуватися в окремих колбах в автоклаві.

6.3.7 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить 600 мл або 0.6 л(кількість посівного матеріалу -30 мл)

Згідно з прийнятим складом поживного загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{пск}$ складають:

$G_ф=V_{псф}\times C_{\sum ф}= 0,6 \times 64,2 =38,52$ г , в тому числі :

Соєва витяжка– $G_1 = G_ф\times C_1/C_{\sum ф} =38,52 \times 50/64,2 = 30$;

Пептон– $G_2=G_ф\times C_2/ C_{\sum ф} =430 \times 1/64,2 = 0,6$

Лактоза– $G_3 = G_ф\times C_3/ C_{\sum ф} = 430 \times 1/ 64,2 = 0.6$;

Агар-агар – $G_4 = G_ф\times C_4/ C_{\sum ф} = 430 \times 2,5/64,2 = 1,5$;

Лимонокислий натрій– $G_5 = G_ф\times C_5/ C_{\sum ф} = 430 \times 6/64,2 = 3,60$;

K_2HPO_4 – $G_6 = G_ф\times C_5/ C_{\sum ф} = 430 \times 2/64,2 =1,2$;

$MgSO_4*7H_2O$ – $G_6 = G_ф\times C_5/ C_{\sum ф} = 430\times 1,2/64,2 =0,721$;

Аскорбінова кислота – $G_6 = G_ф\times C_5/ C_{\sum ф} =4282\times 0.5/64,2 =0,30$;

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде

$V_{ві}=V_{псі}-G_і-V_{ік}=600 -38.52 = 561,5$ мл

Формуємо композиції

$V_{ві}=V_{псі}-G_і-V_{ік}=600 -38.52 = 561,5$ мл

Таблиця 6.3..7.

Склад композицій для стерилізації поживного середовища в колбах на качалці

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/ л	Вміст компонента в 0,6 л середовища ,г (мл)	Композиція	Об'єм композиції , мл
1	2	3	4	5
Соєва витяжка	50	30	А	282,7
Пептон	1	0.6		
Лактоза	1	0.6		
Агар-агар	2,5	1,5		
Вода	-	250		
Конденсат, 10 %	-	-		
Лимонокислий натрій	6	3,6	Б	255,5
K_2HPO_4	2	1,2		
$MgSO_4*7H_2O$	1,2	0.721		
Вода	-	250		
Конденсат 10%	-	-		
Аскорбінова кислота	0.5	0.30	В	61,8
Вода	-	61,5		
Конденсат 10%	-	-		
Сума ∑	64,2	6,1		6,1

Усі композиції готуються у колбах та стерилізуються у окремих колбах в автоклаві.

6.4 Матеріальний баланс на один цикл виробництва(партію).

Таблиця 6.4

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, г, л	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, г, л
1	*2*	*3*	*4*	*5*
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мл, г)			
1.1.	Соєва витяжка	30	Нестерильне ПС	300
1.2.	Пептон	0,6		
1.3.	Лактоза	0,6		

Продовження таблиці 6.4

Продовження таблиці 6.4

1.4.	Агар-агар	1,5		
1.5.	Лимонокислий натрій	3,6		
1.6.	K2HPO4	1,2		
1.7.	MgSO4*7H2O	0,721		
1.8	Аскорбінова кислота	0,30		
1.9	Вода	561,6		
	Всього:	600	Всього:	600
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ (мл)			
2.1.	Нестерильне ПС	600	Стерильне ПС	600
	Всього:	**600**	Всього:	**600**
3.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мл)			
3.1.	Стерильне ПС	600	Посівний матеріал	600
3.2.	Посівний матеріал	60		
	Всього:	**600**	Всього:	**600**
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА на 10 л (г, л)			
4.1.	Соєва витяжка	335	Нестерильне ПС	6,1
4.2.	Пептон	6,72		
4.3.	Лактоза	6.72		
4.4.	Агар-агар	16,8		
4.5.	Лимонокислий натрій	40.3		
4.6.	K_2HPO_4	13,44		
4.7	$MgSO_4*7H_2O$	8,06		
4.8	Аскорбінова кислота	3,36		
4.9.	Вода	5,67		

Продовження таблиці 6.4

Продовження таблиці 6.4

	Всього:	6.1	Всього:	6,1
5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА 10 (л)			
5.1.	Нестерильне ПС	6,1	Стерильне ПС	6,1
5.2.	Конденсат	0	(втрат немає)	0,0
	Всього:	6,1	Всього:	6,1
6.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ на 10 л (л)			
6.1.	Стерильне ПС	6,1	Посівний матеріал	6,1
6.3.	Посівний матеріал з колб на качалках	0,6		
6.4.	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	0,6
	Всього:	**6,7**	Всього:	**6,7**
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА (кг, л)			
7.1.	Соєва витяжка	3335	Нестерильне ПС	54,54
7.2.	Пептон	66,7		
7.3.	Лактоза	66,7		
7.4.	Агар-агар	166,73		
7.5.	Лимонокислий натрій	400,2		
7.6.	K_2HPO_4	133.4		
7.7.	$MgSO_4*7H_2O$	80		
7.8	Аскорбінова кислота	33,35		
7.9	Вода	5,258		
	Всього:	**54,54**	Всього:	**54,54**
8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОБНИЧОГО ФЕРМЕНТЕРА (л)			
8.1.	Нестерильне ПС	54,54	Стерильне ПС	60,6
8.2.	Конденсат	6,06	(втрат немає)	0,0
	Всього:	60,6	Всього:	60.6
9.	ОДЕРЖАННЯ БІОМАСИ *B. BIFIDUM* В ВИРОБНИЧОМУ ФЕРМЕНТЕРІ (л)			

Продовження таблиці 6.4

Завершення таблиці 6.4

9.1.	Стерильне ПС	60,6	Культуральна рідина	60
9.2.	Посівний матеріал інокулятора	6,1		
	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	6,7
	Всього:	**66,7**	Всього:	**66,7**

6.5. Розрахунок технологічного обладнання.

6.5.1. Уточнюючий розрахунок ферментаційного обладнання.

Уточнюючий розрахунок кількості ферментерів.

Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому $К_з$=0,68:

$$V_{гф} = V_ф/К_з = 66,7/0,6 = 111,1 л$$

Обираємо ферментер компанії Sartorius серії BIOSTAT D-DCU об`ємом 100 л[17] : $V_{нф}$ = 100 л. Кількість виробничих ферментерів при заданому $К_з$:

$$N_{фр} = V_{гф}/ V_{нф} = 111/100 = 1,11 – приймаємо 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів:

$$К_{зф} = V_ф/(V_{нф} \times N_{фр}) = 66,7/(100 \times 1) = 0,66$$

6.5.2 Уточнюючий розрахунок кількості інокуляторів

Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора при заданому $К_з$=0,6:

$$V_{гін} = V_{ін}/К_з = 6,7/0,6 = 11,16 л.$$

Як інокулятор обираємо лабораторний ферментер компанії Sartorius серії BIOSTAT® Cplus на 10 л[17] : $V_{ін}$=10 л.

Кількість інокуляторів при заданому $К_{зін}$:

$$N_{інр} = V_{гін}/ V_{нін} = 11,16/10 = 1,116 – приймаємо 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці інокуляторів :

$$К_{зін} = V_{ін}/ (V_{нін}N_{інр}) = 6,7/(10 \times 1) = 0,67$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі (0,5-0,7) приймаємо до установки інокуляторів $N_{Інр}$ + 1 запасний.

Уточнюючий розрахунок кількості качалочних колб

Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому $К_{колб}$=0,2:

$$V_{гколб} = V_{колб}/К_{колб}=600/0,2=3000 \text{ мл}$$

Об'єм 1 качалочної колби $V_{нколб}$ = 750 мл.

Кількість качалочних колб при заданому $К_{колб}$ = 0,2:

$$N_{колб} = V_{гколб}/V_{нколб}=3000/750=4 \text{ колби}$$

6.5.3 Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері

Уточнюючий розрахунок реактора для приготування композиції А

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб}$ = 0,5…0,9:

$$V_{Апа} = V_А/К_{зб} =33,63/0,6=56,06 \text{ л.}$$

Оберемо збірник змішувач фірми «Промвіт» об`ємом 63 літри[28] . Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить :

$N_р = V_{Апа}/V_{рст}$ =56,06/63=0,89 – приймаємо 1 . Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$$К_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст}\times N_р) = 33,63/63=0,53$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в межах (0,5 – 0,9), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

Уточнюючий розрахунок реакторів-змішувачів для приготування композиції Б

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції Б. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб}$ = 0,7…0,9:

$$V_{Апа} = V_А/К_{зб} =20,61/0,7=30,9 \text{ л.}$$

обираємо реактор змішувач фірми «Промвіт» об`ємом 63 літри [28].

Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить:

$N_р = V_{Апа}/V_{рст}$ = 30,9/63=,5 – приймаємо 1 . Уточнюємо коефі-

цієнт заповнення реактора :

$$К_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст}\times N_р) = 20,61/(63*1)=0,34$$

Приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

Уточнюючий розрахунок реакторів-змішувачів для приготування соєвої витяжки.

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб} = 0,5…0,6$:

Для приготування поживного середовища необхідно 4 л соєвої сироватки

Кількість сої при цьому 800 г

Для

$$V_{Апа} = V_А/К_{зб} =4,8/0,5=9.6л.$$

обираємо реактор змішувач фірми «Перрі відекс» об`ємом 10 л [29].

Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить:

$N_р = V_{Апа}/V_{рст} = 9,6/10=0,96$ – приймаємо 1 . Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$$К_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст}\times N_р) = 4.8/(10*1)=0,48$$

Приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.). Кількість реакторів 2.

Уточнюючий розрахунок реакторів-змішувачів для приготування мийних розчинів

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб} = 0,7…0,9$:

Кількість мийного розчину становить 128 л.

Для

$$V_{Апа} = V_А/К_{зб} =128/0,7=182л.$$

обираємо реактор змішувач фірми «Перрі відекс» об`ємом 150 л [30].

Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить:

$N_р = V_{Апа}/V_{рст} = 182/150=1.2$ – приймаємо 1 . Уточнюємо коефі-

цієнт заповнення реактора :

$$К_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст} \times N_р) = 128/(150*1)=0,84$$

Приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання наведеного на технологічній схемі розписана у таблиці 7.1.

Таблиця 7.1

Специфікація обладнання для апаратурної схеми виробничого біосинтезу та допоміжних робіт біосинтезу біомаси *B. bifidum* 1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика(виробник)
1	2	3	4
Р-1, Р-2	Реактор змішувач для приготування композицій	2	Реактор місткістю 63 л оснащений турбінною мішалкою 20-500 об/хв та сорочкою підігріву фірми «Промвіт»[58]
Р-3,Р-4	Реактор-змішувач для приготування соєвої сироватки	2	Реактор місткістю 10 л оснащений турбінною мішалко .кількість обертів 20-500 об/хв мішалкою та сорочкою підігріву фірми «Perri Videx»[59]
Р-5	Ємність-реактор на 150 л для приготування розчину концентрату Біомой.	1	Реактор місткістю 150 л оснащений турбінною мішалкою 20-500 об/хв та сорочкою підігріву фірми «Perri Videx»[60]
Р-6	Реактор-ємність для замочування сої		Реактор місткістю 10 л оснащений мішалкою та сорочкою підігріву фірми «Perri Videx»[58]
Н-7, Н-8, Н-.9, Н-10. Н-11, Н-12, Н-.13, Н-14.	Насоси	8	Насос перистатичний Rotho PSF3 фірми ТОВ «Ватерпасс» [62]
А-15	Автоклав	1	Автоклав Panasonnic MLS-3751L об`ємом 50 л [41]
ФР-16	Ферментер-інокулятор	1	Ферментер BIOSTAT® Cplus на 10 л фірми «Sartorius» оснащений турбінною мішалко 10-1500 об/хв [31]
ФР-17	Ферментер виробничий	1	Ферментер на 100 л BIOSTAT® D-DCU фірми «Sartorius» оснащений турбінною мішалко 10-1500 об/хв [31]
ФІ-18 ФІ-19	Фільтри індивідуальної очистки	2	Фільтри Bonеco A7014 фільтр. матеріал фторопласт Е=99,999[63]
З-20	Збірник реактор	1	Реактор місткістю 10 л оснащений мішалкою та сорочкою підігріву фірми «Perri Videx»[59]

Продовження таблиці 7.1

Д-21,Д-22,Д-23,Д-24, Д-25, Д-33	Дозатори об`ємно вагові	5	Дозатор фірми «АСВІК ЦЕНТР» ДВП-2[61]
Р-26	Реактор-збірник культуральної рідини	1	Реактор з НЖ сталі AISI 304, місткістю 100 л виготовлений фірмою ТОВ « Промвіт», обладнаний мішалкою якорного типу з максимальною швидкістю до 900 об/хв та потужністю 1,5 кВт, обладнаний рубашкою, макс Т в корпусі до 98 ^{0}С[64].
Ц-28	Центрифуга	1	Центрифуга пілотна фільтрувальна CEPA TZ 5 з максимальною загрузкою 60 л. Максимальні оберти барабана: до 1900 об/хв Виробник : ООО “Біотехно», Росія [65].
Р-29	Реактор	1	Реактор з Н/Ж сталі 316L AISI обладнаний сорочкою для нагріву та охолодження, робочий тиск до 5 бар, обладнаний донною якорною мішалкою з потужністю обертової швидкості до 500 об/хв. Виробник ТОВ Промвіт». Україна [66].
Л-31	Ліофільна сушарка	1	Ліофілізатор вакуумний моделі FD-150. Робоча ємність 300 л, потужність 18 кВт, виробник: Hangzhou Ouhui Machinery Co., Ltd. Zhejiang, China [67].

Продовження таблиці 7.1

Завершення таблиці 7.1

ПМА-32	Автомат пакувальний	1	Автомат пакувальний для пакування у ПЕТ-пакети та коробки моделі FYL – 100, місткість 40 кг точністьдо 1%, продуктивність 30 шт/хв, мінімальне дозування = 100 г, тип дозування-поршневий, потужність 900 кВт[68].
Н-27, Н-30	Насоси перистальтичні	2	Насос перистальтичний фірми «ООО Ватерпасс» **Rotho PSF2** потужністю до 700 л/год, [69].

РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва та персоналу.

ДР1.1 Підготовка мийних та дезинфікувальних засобів

Для та миття поверхонь приміщення використовують воду очищену, оскільки виробництво не є фармацевтичного рівня.

ДР 1.1.1. Приготування робочого розчину засобу Біомой для миття та дезинфекції обладання.

Для миття те дезинфекції обладнання необхідно полова об`ємів цього обладнання робочого розчину у даному випадку засобу Біомой. Враховуючи, ферментер і інокулятор, збірники для приготування композицій А і Б на 10 та 50 л, отже необхідний об`єм становить (100+10+10+10+63+63)/2 = 128 л 0,3 % робочого розчину.

На технічних вагах зважують 3,84 кг засобу Біомой, переносять у реактор на 150 л(Р-5) та доливають 124,16 л води. Вмикають мішалку і перемішують протягом 5 хв до повного розчинення.

ДР 1.1.2. Приготування робочого розчину засобу Хлорантоїн для миття приміщення.

На технічних вагах зважують 1,25 кг засобу хлоратоїн , переносять у реактор на 50 л та доливають 20 л води. Вмикають мішалку і перемішують протягом 2 хв до повного розчинення.

ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень

ДР1.2.1 Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводиться 1 раз на місяць. Мийка проводиться за допомогою 2 % розчину Хлоратоїну, заздалегідь приготованого . Миються як підлога так і стіни, двері, вікна.

ДР1.2.2 Щоденне прибирання

Щоденне прибирання. Мийка здійснюється лише для підлоги. Миють використовуючи 2 % розчину Хлоратоїну, заздалегідь приготований.

Перед початком роботи персонал повинен пройти санітарно-гігієнічну підготовку, а саме миття рук туалетним або господарським милом та дезінфікцію 70%-им етиловим спиртом. Також обов'язковим є наявність медичного халату та шапочки.

ДР1.3 Підготовка обладнання

ДР1.3.1 Технічний огляд обладнання

Обладнання проходить такі етапи: Загальний *технічний огляд, перевірка на герметичність, пробний пуск, настройка параметрів*

Технічний огляд апаратури проводять після миття та перед запуском процесу аби виявити наявність чи присутність дефектів у ній.

ДР1.3.2 Миття обладнання

Миття та обладнання буде проводитися вручну . Мийка проводиться мийним засобом «Біомой» (його робочим розчином). Кількість 0,3% робочого 128 л(від ДР 1.1.1). Температура миття 70 ^{0}С

ДР1.3.3Перевірка на герметичність.

Дана стадія стосується в першу чергу основного ферментера , інокулятора. Для цього у апарат на якому герметично затягнута вся арматура подається аераційне повітря до набору надлишкового тиску у 0,1-0,2-МПа, Перекривають прохід повітря, та фіксують показання манометра на протязі 40-60 хв. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа – апарат є герметичним. Якщо дане значення перепаду тиску перевищує 0,01 МПа проводять перевірку і знаходять місце розгерметизації методом омилення апарата(його опорних з`єднаня), оскільки ферментер є невеликого об`єму? а цей метод є дуже простим і дешевим.

Апарат і місця з`єднань деталей апарата мильним розчином , для цього на ферментер та місця з`єднань наносять мильний розчин та чекають певний час, у місцях розгерметизації виникають невеликі бульбашки години, операція триває 30-40 хв. При знаходженні місця розгерметизації затягують з`єднальну арматуру.

І повторюють операцію, якщо це не дало результатів то міняють прокладки з`єднань [20].

ДР1.3.4 Стерилізація.

Стерилізація проводиться подачею гострої пари у апарат за температури 135 ^{0}С, упродовж 1 години.

ДР 1.4. Підготовка персоналу

Перед початком роботи персонал повинен пройти навчання, атестацію та санітарно-гігієнічну підготовку, а саме миття рук туалетним або господарським милом та дезінфікцію 70%-им етиловим спиртом. Також обов'язковим є наявність медичного халату та шапочки.

ДР 2 Приготування і стерилізація допоміжних розчинів

ДР 2.1. Приготування допоміжних титрувальних розчинів

Для корекції pH приблизно беремо 4 мл на літр середовища(культуральної рідини) кожного з компонентів(соляної кислоти 6% та гідроксиду натрію 10%.. Середовище(кількість культуральної рідини на початку процесу) у виробничому ферментері становить 60 л а у інокуляторі – 6 л , отже треба приготувати допоміжних розчинів стільки: 264 мл

ДР 2.1.1 Приготування розчину HCl

У колбу об'ємом 500 мл вносять 210 мл питної води і 54 мл 36 % соляної кислоти, отримують 264 мл 6 % хлорної кислоти. Стерилізують холодною стерилізацією пропусканням через фільтр з порами 0,2 мкм.

ДР 2.1.2 Приготування та стерилізація розчину NaOH

На технічних вагах зважують 26,4 г гідроксиду натрію, переносять у колбу об'ємом 500 мл та додають 237,6 мл питної води. Стерилізують в автоклаві при температурі 131 ^{o}С 40 хв.

ДР 2.2. Приготування соєвої сироватки

ДР 2.2.1 Замочування

Для одного циклу ферментації враховуючи ПМ та виробничий біосинтез необхідно приготувати 4 л (кг) соєвої сироватки.

У збірник місткістю 10 л(Р-6) вносять наважку соєвого зерна, яку перед цим зважують на вагах. Наважка становить 0.8 кг. У збірник додають воду у кількості 4 л . Збірник закривають та подають пару у рубашку, нагрівають до температури 50 ^{0}С та витримують 1 годину. Після цього воду зливають а замочену сою подають на інші операції.

ДР 2.2.2 Оброблення содою.

Замочене зерно сої відділене від замоченої води завантажують у реактор на 10 л (Р-3), який містить 4 л 0.5 % розчину Na_2CO_3. Розчин готують так: зважують 0,02 кг карбонату натрію, завантажують в реактор та додають 4 л води питної. Вмикають мішалку та перемішують 1 хв. Після завантаження соєвого замоченого зерна до реактор з розчином карбонату натрія закривають запірну арматуру, подають пару в рубашку та в реактор. Та нагрівають суміш у реакторі до 120 ^{0}С, витримують 5 хв. Дана операції потрібна для позбавлення від непотрібних речовин(здебільшого спиртів) після 5 хвилин Сою відфільтровують від розчину а розчин зливають у каналізацію.

ДР 2.2.3 Подрібнення та Екстракція

Оброблене соєве зерно подрібнюють на дробарці та задопомогою допоміжної ємності завантажують в реактор на 10 л(Р-4) і додають 4 л води питної. Закривають запірну арматуру та проводять екстракцію при температурі 100 ^{0}С протягом 10-20 хв. Після екстракції екстракт фільтрують і заливають у цей же реактор

ДР 2.2.4 Пастеризація та фільтрування

Пастеризацію після фільтрування проводять у цьому ж реакторі при 90 ^{0}С протягом 15 хв.

ДР 2.2.5 Осадження та фільтрування.

Пастеризований екстракт сої перекачують у збірник на 10 л(Р-4) охолоджують до температури 37 ^{0}С та понижують pH за допомогою pH метра та 6 % розчину соляної кислоти (від ДР 1.1) до pH 4.5. Потім нагрівають до 90 ^{0}С подачею пари та витримують 10 хв. Осад, що випав фільтрують, а екстракт що залишався піддають відновленню pH за допомогою 6% розчину натрій

гідроксиду (ДР 1.2) до 7,0. Після фільтрування готову соєву витяжку подають у збірник для зберігання, де зберігають при 10 ^{0}С. Термін зберігання до 1,5-2 тижнів.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1 Приготування і стерилізація 600 мл поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 600 мл поживного середовища (10 % від об'єму середовища стадії 1). Джерелом вуглецю в середовищі є глюкоза пептон та частково м`ясний екстракт, джерелом азоту – цитрат амонію, пептон і м`ясний екстракт частково, які входять до складу середовища. Вміст компонентів для приготування 300 мл середовища наведено в табл.5.1, середовище для підготовки інокуляту не відрізняється від виробничого[25].

Таблиця 3.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 300 мл середовища.

Компоненти поживного середовища	**Концентрація компонентів г/л**	**Кількість компонентів поживного середовища на 600 мл, г**	**Композиція**	**Кількість води, мл**	**Об`єм композиції, мл**
Соєва витяжка Пептон Лактоза Агар-агар	 50 1 1 2,5	 30 0.6 0,6 1,5	А	250	282,7
Лимонокислий натрій K_2HPO_4 $MgSO_4*7H_2O$	 6 2 1,2	 3,6 1,2 0.721	Б	250	255,5
Аскорбінова кислота	0.5	0,3		61.5	61,8
Всього	**63,7**	**38,5**		**561,5**	**600**

ДР 3.1.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах відміряють 30 г соєвої сироватки(від ДР 2.2.5), 0.6 г пептону, 0,6 г лактози та 1,5 г агар-агару . Наважку поміщають у колбу об'ємом 500 мл , додають 250 мл питної води, перемішують нагрівають до температури 70 ^{0}С та витримують 2 хв для розчинення агару. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 120 °С упродовж 20 хв.

ДР 3.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 3,6 г лимонокислого натрію , 1,2 г фосфату калію та 0.721 г сульфату магнію. Підкислюють до pH 4,5 розчином соляної кислоти(ДР 3.1.1). Наважку поміщають у колбу об'ємом 500 мл, добавляємо 250 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 3.1.3 Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 0.3 г аскорбінової кислоти. Наважку поміщають у колбу об'ємом 100 мл, добавляємо 61,5 мл питної води, перемішують. Пропускають через фільтр з діаметром пор 0.1 -0,2 мкм(Холодна стерилізація)

ДР 3.2 Приготування і стерилізація 6,7л поживного середовища для одержання посівного матеріалу у інокулятор об`ємом 10 л.

Таблиця 3.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6,7 л середовища

Компоненти поживного середовища	**Концентрація компонентів г/л**	**Кількість компонентів поживного середовища на 6,1 л, г**	**Композиція**	**Кількість води, л**	**Об`єм композиції, л**
Соєва витяжка Пептон Лактоза Агар-агар	 50 1 1 2,5	 335 6,72 6,72 16,8	А	2,5	2,865

Продовження таблиці 3.2

Завершення таблиці 3.2

Лимонокислий натрій K_2HPO_4 $MgSO_4*7H_2O$	6 2 1,2	40,3 13,44 8,06	Б	2,5	2,562
Аскорбінова кислота	0.5	3.36		0.670	0,673
Всього	**63,7**	**430,4**		**5.67**	**6,1**

ДР 3.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах відміряють 335 г соєвої сироватки(від ДР 2.2.5), 6.72 г пептону, 6.72 г лактози та 16.8 г агар-агару . Наважку поміщають у колбу об'ємом 5 л , додають 2,5 л питної води, перемішують нагрівають до температури 70 ^{0}С та витримують 2 хв для розчинення агару. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 120 °С упродовж 20 хв.

ДР 3.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 40,3 г лимонокислого натрію , 13.44 г фосфату калію та 8.06 г сульфату магнію. Підкислюють до pH 4,5 розчином соляної кислоти(ДР 2.1.1). Наважку поміщають у колбу об'ємом 5 л, добавляємо 2,5 л питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 3.2.3 Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 3.36 г аскорбінової кислоти. Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л, добавляємо 0,67 л питної води, перемішують. Пропускають через фільтр з діаметром пор 0.1 -0,2 мкм(Холодна стерилізація)

ДР 3.3 Приготування і стерилізація поживного середовища об`ємом 66,7 л для виробничого культивування у ферментері на 100 л

Таблиця 3.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 31 л середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація компонентів г/л	Кількість компонентів поживного середовища на 66,1 л, г	Композиція	Кількість води, л	Конденсат	Об`єм композиції, л
Соєва витяжка Пептон Лактоза Агар-агар	 50 1 1 2,5	 3335 66,72 66,72 166,8	А	30	3,63	36,99
Лимонокислий натрій K_2HPO_4 $MgSO_4*7H_2O$	 6 2 1,2	 400,2 133,4 80	Б	20	2,424	20,61
Аскорбінова кислота	0.5	35,35		0,258	-	0,291
Всього	**63,7**	**4284,19**		**52,42**		**60,6**

ДР 3.3.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах відміряють 3335 г соєвої сироватки(від ДР 2.2.5), 66.72 г пептону, 66.72 г лактози та 166.8 г агар-агару . Наважку поміщають у реактор –змішувач Р-1 об'ємом 63 л , додають 30 л питної води, перемішують вмикаючи мішалку нагрівають до температури 70 ^{0}С подачею глухої пари та витримують 2 хв для розчинення агару. Подають композицію у ферментер наососм Н-10 . Закривають кришку і стерилізують і при температурі 120 °С упродовж 20 хв.

ДР 3.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 400,2 г лимонокислого натрію , 133.4 г фосфату калію та 80 г сульфату магнію. Підкислюють до pH 4,5 розчином соляної кислоти(ДР 2.1.1). Наважку поміщають реактор-змішувач на 63 л (р-2) л, добавляють 20 л питної води, перемішують. Закривають кришку реактора і стерилізують при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 3.3.3 Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 35,35 г аскорбінової кислоти. Наважку поміщають у колбу об'ємом 5 л, добавляємо 2, 424 л питної води, перемішують. Пропускають через фільтр з діаметром пор 0.1 -0,2 мкм(Холодна стерилізація)

ТП 4 Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1 Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Bifidobacterium bifidum* 1 зберігають у 40 % гліцериновому розчині при температурі -20 ^{0}С у морозильній камері. Перед активацією культури її розморожують на водяній бані.

ТП 4.2 Одержання робочої культури на агаризованих середовищах.

Колекційну культуру відновлюють, в пробірках з середовищем MRS, потім розсівають мікробіологічною петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із тим же середовищем і вирощують при температурі 37 ^{0}С упродовж 48 годин.

ТП 4.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані ізольовані колонії (від ТП 5.2) пересівають в пробірки зі скошеним агаризованим MRS- середовищем (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 24 год, температура 37 ^{0}С[25].

ТП 4.4 Вирощування культури в колбах

Для вирощування посівного матеріалу об'ємом 750 мл додають в асептичних умов весь об`єм композиції А(282,7мл) (від ДР 3.1.1), композиції Б (255,5 мл) (від ДР 3.1.2) та композиції В (61,8 мл) (від ДР 3.1.3) У сумі виходить 600 мл. За допомогою pH метра та розчину гідроксиду натрія встановлюють pH на рівні 7,0.

Одержане середовище перемішують і розливають по 150 мл в 4 стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл. Туди вносять посівний матеріал з пробірок з MRS- агаром, засіяних продуцентом раніше. Колби закривають гумовими пробками аби створити анаеробні умови. Параметри культивування :, температура 37 ^{0}C, тривалість – 12 годин[6].

ТП 4.5 Вирощування культури в інокуляторі об`ємом 10 л ( коефіцієнт заповнення 0,61 – отримання культури об`ємом 6,1 л,)

У стерильний ферментер-інокулятор, стерилізований розбірно в автоклаві, об`ємом 10 л, подають стерильну композицію А (2,865 л від ДР 3.2.1), композиція Б (*ДР 3.2.2*)(2,562 л), композиція В (*ДР 3.2.3*)(0.673 л). Потім додають посівний матеріал у кількості 600 мл (з 4 колб на качалках), зі стадії вирощування на качалках(ТП 5.4) через засівну колбу в асептичних умовах, потім за допомогою 6 % розчину гідроксиду натрія(від ДР 3.1.2) вирівнюють pH до 6,8-7,0, подають через барботер газоподібний азот для витіснення повітря до тиску в 1,2-1,3 атм, перекривають подачу азоту та герметизують ферментер і починають процес культивування.

Параметри культивування : pH-6,8-7,0 температура 37 ^{0}C, тривалість -12 години, анаеробні умови, 230 обертів на хвилину мішалки.[25].

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1 Виробниче культивування

Виробниче культивування здійснюють у біореакторі з робочим об'ємом 100 л У стерильний біоректор подаються стерильні композиції: композицією А (36,99 л від ДР 3.3.1). В асептичних умовах вносять композицію В з колби (від ДР 3.3.3,об`ємом 0,291 л) та композицію Б ( від ДР 3.3.2, об`ємом 20,61 л), і посівний матеріал через трубу перетиснення (кількість 6,1 л) від ферментатора на 50 л (ТП 4.5). Під час процесу культивування підтримують анаеробні умови подачею азоту через барботер до 1,2-1,5 атм, при досягненні тиску подачу перекривають[20,25]. Тривалість культивування становить 30 год[25]. Культивування проводять до початку або до середини стаціонарної фази росту [25].

pH підтримують на рівні 6,8-7,0 температура культивування - 37 ^{0}C 230 обертів на хвилину мішалки[26]. Кожні 5 годин відбирають проби для аналізу процесу ферментації(концентрації біомаси, концентрація джерела вуглецю і азоту у культуральній рідині. Процес ферментації орієнтовно триває до 48 години. Однак остаточно процес зупиняють при досягненні концентрації біомаси у 1*10^8 КУО/мл[6].

ТП 6. Відділення біомаси від культуральної рідини

*ТП 6.1 Відділення біомаси***.**

Культуральну рідину з робочого ферментера перекачують до реактора-збірника Р-1. Зберігають культуральну рідину при перемішуванні у значенні 60 об/хв. Термін зберігання до 24 годин. З реактора Р-1 культуральну рідину подають на центрифугу Ц-2 насосом Н-7. Вмикають центрифугу та виставляють 1900 об/хв. Центрифугують протягом 25 хвилин. Біомасу збирають та переносять до реактора Р-3.

ТП.7 Змішування з захисним середовищем.

ТП 7.1 Суспендування біомаси.

До біомаси в реакторі Р-3 додають 65 л води очищеної, вмикають мішалку на 100 об/хв, перемішують упродовж 10 хв. Одержану таким чином суспензію витримують при перемішуванні 80 об/хв упродовж 25 хвилин при температурі 10 ^{0}C до приготування захисного середовища.

ТП 7.2 Приготування захисного середовища

На технічних вагах зважують 26 кг сорбітолу, 13 кг оцтовокислого натрію. Через об`ємно-ваговий дозатор відміряють 22,75 л молока та вносять у реактор на 200 л Р-4. Вмикають перемішуючий пристрій на 80 об/хв та підігрівають реактор до 45 ^{0}C. Порційно вносять зважені 26 кг сорбітолу до повного розчинення, далі вносять 13 кг натрію оцтовокислого також порційно та до повного розчинення. Після цього до одержаного розчину додають 3,25 л гліцерину при перемішуванні.

Залишають реактор на 10 хв при таких параметрах: перемішування 80 об/хв, температура 45 ^{0}С. Кількість одержаного захисного середовища становить 65 л.

ТП 7.3 Змішування захисного середовища та біомаси.

Суспендовану біомасу з реактора Р-3 порційно насосом Н-8 подають до реактора з готовим захисним середовищем Р-4. Під час подачі у реакторі Р-3 мішалку вимикають, а у реакторі Р-4 вмикають та встановлюють режим перемішування 60 об/хв Після подачі усієї суспензії з біомасою об`єм композиції має становити 130 л . Після подачі останньої порції суспензії з біомасою перемішування продовжують ще 5 хв. Потім реактор Р-4 з вмістом охолоджують подачею холодної води до 10 ^{0}С

ТП.8 Ліофільне висушування.

ТП 8.1 Ліофілізація

Композицію біомаси та захисного середовища з реактора Р-4 вручну завантажують у ємності для ліофілізації та вставляють у камеру ліофілізатора Л-5. Після завантаження всього об`єму композиції ліофілізатор герметизують , відкачують повітря та встановлюють вакуум на значенні 0,8 кгс/см^2. Заморожують композицію до стану температури -30 ^{0}С з динамікою 1-2 ^{0}С/год. Починають процес ліофільного сушіння за температури 40 ^{0}С.

ПМВ 9.

ПМВ 9.1 Пакування у первинну тару

Ліофільно висушену біомасу від ліофілізатора Л -5 вручну подрібнюють та переносять у проміжні ємності, звідки завантажують у бункер пакувального апарату ПМА-6. Також пакувальний апарат ПМА-6 обладнують новим пакетом заготовок для ПЕТ-мішків та картонних заготовок для коробок пакування. Завантажують тримач клейкої стрічки обклеювальним матеріалом та починають процес пакування. Дозування продукту встановлюють 500 г з точністю до 1%. Продуктивність встановлюють 30 упаковок/год.

ЗВ 10. Знешкодження відходів

Відпрацьовані робочі розчини мийних та мийно–дезінфікуючих засобів, воду та аераційне повітря знешкоджують.

ЗВ 10.1. Знешкодження газоподібних відходів

Відпрацьоване повітря, що надходить від *ТП 5.4, ТП 5.,5 ТП 6.1,* відправляють у системи знешкодження повітряних відходів.

ЗВ 10.2. Знешкодження рідких відходів

Розчини миючих та дезінфікуючих засобів від *ДР 1.2.1, ДР 1.2.2, ДР* знешкоджують в аеротенках очисних споруд.

РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва

9.1 Карта постадійного контролю

Наводимо карту постадійного контролю критичних точок процесу виробництва.

Таблиця 6.1

Карта постадійного контролю виробництва біомаси *Bifidobacterium bsfidum* 1

Номер контрольної точки та назва стадії	**Об`єкт контролю та показник, що визначається**	**Засоби та методи контролю**	**Періодичність перевірки та порядок відбору проб**	**Нормативна характристека показника, що визначається**
1	**2**	**3**	**4**	**5**
Кх, 1.1.1 Приготування розчину засобу Біомой	Коцентрація розчину хлорного вапна	Хімічний метод	Після приготування розчину	С=0.3%
Кт 1.2.1 Підготовка виробничих приміщень	Підлога, стіни, обладання ,чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Кт 1.3.1 Миття розбірних частин обладнання	Розбірні частини обладнання, мийний розчин, його температура, чистота	Термометр технічний	Під час проведення операції	Т =45^{0}С
Кт 1.3.2 Миття обладання	Мийний розчин для обладнання, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції	Т =70^{0}С t- 1 год

Кт 1.3.3 Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник	Тис визначається безперервно під час виконання операції	t- 0,5 год Р= 0.07мПа
Кт 1.3.4 Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час	Термометр, годинник	Температура визначається безперервно під час виконання операції	t- 0,5 год Т=135^{0}С
Кт, Кх 2.1.1 Приготування і стерилізація розчину соляної кислоти	Концентрат соляної кислоти, температура, час, стерильність, концентрація	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	С= 6% Т=131^{0}С t=40 хв Відсутність мікробіоти

Кт, Кх 2.1.2 Приготування і стерилізація розчину гідроксиду натрію	Сухий гідроксид натрію, температура, час, стерильність, концентрація	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	С= 6% Т=131^{0}С t=40 хв відсутність мікробіоти
Кт, Кх 2.2.1 Замочування сої	Температура, гідромодуль , час замочування	Термометр технічний, годинник,	Температура визначається безперервно під час процесу	Гідромодуль 1:5 Т=50^{0}С t= 1 год
Кт, Кх 2.2.2 Оброблення содою	Температура, гідромодуль , час замочування, концентрація натрію карбонату	Термометр технічний, годинник,	Температура визначається безперервно під час процесу	С= 0.5 % карбонату натрія Т=120^{0}С t=5 хв
Кт, Кх 2.2.3 Екстракція	Температура, час екстракції	Термометр технічний, годинник,	Температура визначається безперервно під час процесу	Т=100^{0}С t=10--20 хв

Кт, Кх 2.2.4 Пастеризація	Температура, час пастеризації	Термометр технічний, годинник,	Температура визначається безперервно під час процесу	$T=90^0C$ t=5 хв
Кт, Кх 2.2.5 Фільтрування та осадження	Температура, pH	Термометр технічний, годинник, pH-метр	Температура визначається безперервно під час процесу ,pH також	$T=90^0C$ t=10 хв pH=4,5
Кт, Км 3.1.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	$T=120^0C$ t=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	$T=131^0C$ t=40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.3 Приготування і	Композиція В	, годинник, мікробіологічний	Температура визначається	

стерилізація композиції В	Діаметр пор стерильність.	контроль	безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	Пори 0,1 мкм Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	$T=120^0C$ t=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	$T=131^0C$ t=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В Діаметр пор стерильність.	, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	Пори 0,1 мкм Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.1	Композиція А	Термометр технічний,	Температура	

Приготування і стерилізація композиції А	, температура, час, стерильність.	годинник, мікробіологічний контроль	визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	$T=112^0C$ t=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	$T=131^0C$ t=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В Діаметр пор стерильність.	, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	Пори 0,1 мкм Відсутність мікробіоти

Кт, Км 4.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	$T=37^0C$ t=12 год n=230 об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 10 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, pH-метр мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	$T=37^0C$ t=12 год n=230 об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.1 Виробничий біосинтез у ферментері на 100 л	Культуральна рідина, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури, концентрація біомаси виражена у (КУО)	Термометр технічний, годинник, тахометр, pH-метр мікробіологічний контроль, фотоколориметричний метод визначення концентрації КУО	Під час вирощування культури в ферментері, відбір проб: кожні 6 годин	$T=37^0C$ t=24 год n=230 об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти, $K= 5*10^{11}$ КУО/мл

Кт 7.1 Відділення біомаси	Оберти центрифуги, Час центрифугування	Тахометр технічний Годинник	Під час процесу та перед початком	n_2 =1900 об /хв t=25 хв
Кт 8.1 Суспендування біомаси	Температура Оберти мішалки Час	Термометр технічний Тахометр технічний годинник	Під час проведення технологічного процесу	T =10 ^{0}C n_2 =100 об /хв t = 10 хв
Кт 8.2 Приготування захисного середовища	Температура Оберти мішалки Час	Термометр технічний, годинник Тахометр технічний	Під час проведення технологічного процесу та перед йог опочатком	T = 45^{0}C n_2 =80 об /хв t = 10 хв
Кт 8.3 Змішування біомаси з захисним середовищем	Температура Оберти мішалки Час	Термометр технічний, годинник Тахометр технічний	Перед початком процесу та під час процесу	T = 10^{0}C n_2 =60 об /хв t = 10 хв

Кт 9.1 Ліофільне висушування	Кінцева температура заморожування Динаміка заморожування Температура сушіння Тиск	Термометр технічний, Вакуумометр	Під час процесу пакування та перед початком процесу	$T = -30\ ^0C$ $T_1 = 2\ ^0C$ /год $T_{суш} = 40\ ^0C$ $P = 0{,}8$ кгс/см^2
Кт 9.1 ПМВ	Маса дозування Точність дозування Продуктивність процесу	ваги Візуальний контроль	Під час процесу пакування та перед початком процесу	m = 500 г u=1 % Q=30 упак/год
Км 10.1	Концентрація КУО у препараті	Мікробіологічний контроль	Після процесу пакування	С= не менше $0{,}45*10^9$ КУО/г

9.2 Мікробіологічний контроль.

Мікробіологічний контроль. Здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопуванням на світловому мікроскопі при збільшенні х90. Культуральну рідину розсівають на чашки Петрі до ізольованих колоній з використанням м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення сторонніх бактерій, та з середовищем Сабуро − для виявлення дріжджів і грибів. Також додатково роблять розсів на середовище Блаурока для виявлення сторонніх молочнокислих бактерій зокрема сторонніх біфідобактерій. Основну увагу роблять на розсів з середовищем Сабуро оскільки основу сторонніх культур можуть становити дріжджі та мікроміцети. Для мікроскопування використовують препарати «роздавлена крапля». Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, накривають накривним скельцем і розглядають з об'єктивом 40х, або з імерсійною системою на ×90 . При оцінці морфолого-культуральних ознак продуцента перш за все звертають увагу, на характерні особливості колоній продуцента[70]. (*рис* 9.1.1).

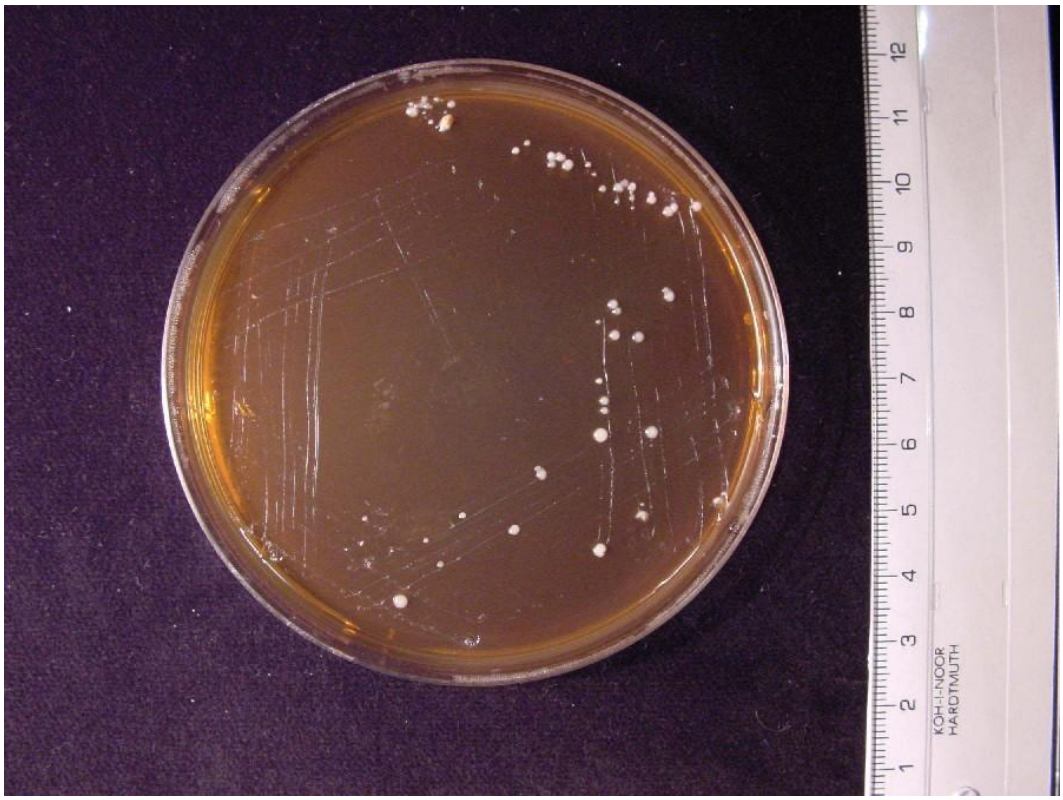


Рисунок 9.2.1 ***Bifidobacterium bifidum* 1 [71].**

Опис колонії має наступний вигляд: колонії круглясті, кремого-білого кольору, при старінні колір стає насичений та темніє відсутні зморшки. Перед мікроскопією звичайного препарату роблять препарат з фарбуванням За- Грамом:

Готують мазковий препарат та фіксують його на полум`ї пальника. На фіксований мазок кладуть просочений фарбою генціанвіолету фільтрований папір і наносять 2-3 краплі дистильованої води і через 2 хвилини його знімають, а залишки фарби зливають. На мазок наносять розчин Люголя і через 2 хвилини його зливають.

Мазок знебарвлюють 96% етиловим спиртом, наносячи його на 20-30 сек.. Мазок ретельно промивають водою. На 1-2хв наносять фуксин Пфейфера. Фарбу змивають, а препарат висушують, і мікроскопують. Грампозитивні мікроби фарбуються у фіолетовий колір, і грамнегативні у червоний[72]. (*рис* 9.1.2).

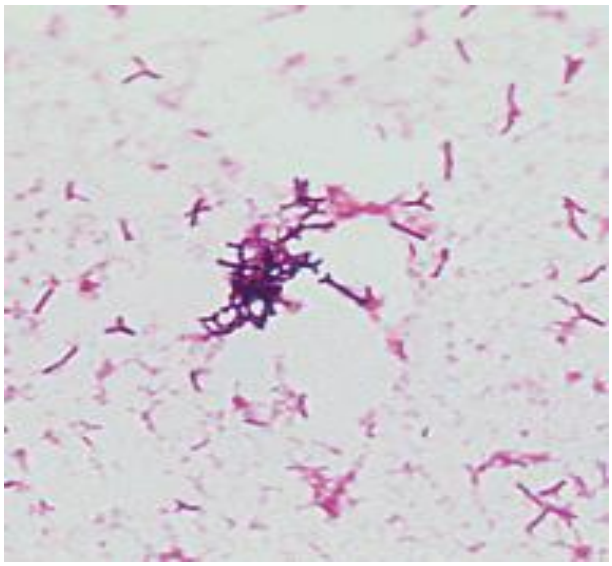


Рис 9.2.2 **Мікроскопія *Bifidobacterium bifidum* 1 при фарбуванні за грамом при збільшенні х90[72].**

9.3 Показники росту і синтезу цільового продукту .

9.3.1 Концентрація біомаси.

Визначення концентрації біомаси.

Визначення концентрації живих клітин.

В ряду послідовних десятикратних розведень досліджуваного зразка з 2 останніх розведень (ступінь розведення залежить від кількості КУО в 1 мл досліджуваного препарату).

Роблять кілька послідовних десятикратних розведень культуральної рідини, орієнтовно 7-8 штук. Далі по 0,1 мл мікробної суспензії висівають на чашки Петрі з поживним середовищем (середовищем Блаурока). Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні середовища шпателем Дрігальского або за допомогою скляних бус до повного вбирання (висихання) суспензії. Чашки закривають і поміщають перевернутими догори дном в термостат для інкубації. Посіви інкубують при температурі (37 ± 1) ^{o} С протягом 12- 24 год., та досить тривалий у часі. Методика проводиться в анаеробних умовах під струменем інертного газу аргону або азоту. Краї чашок петрі змащують стерильним вазеліновим маслом, частину інертного газу закачують у чашку Петрі та накривають накривною частиною, притираючи вазелін до щільного зє`днання. Роботу проводять в асептичних умовах.

Після інкубації підраховують кількість колоній, що виросли після неї , та множать на розведення культуральної рідини і множать на їх кількість. Після число перемножають на 1 мл суспензії і отримують кінцеве значення[19].

Визначення загальної концентрації біомаси:

Концентрацію біомаси в 1 л культуральної рідини визначають за допомогою фотоелектроколориметра(ФЕК), а саме за різницею оптичної густини D клітинної суспензії та еталонного зразка і переводять відповідне значення оптичної густини за допомогою калібрувального графіка(концентрацію біомаси)) виражену у г/л.

Концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком у грами за допомогою калібрувального графіка відносно еталонного зразка.

Для цього у пробірки вносимо 9 мл дистильованої води і 1мл культуральної рідини. Суміш збовтуємо і вимірюємо оптичну густину на фотоелектроколориметрі (при довжині хвилі 540 нм)[73].

9.3.3 Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення концентрації джерела вуглецю

Визначення концентрації Сахарози

Основним компонентом середовища культивування є соєва витяжка(сироватка), приготовлена екстракцією подрібненого соєвого зерна, яке міться 30% вуглеводів від сухої маси. Більша частина цих вуглеводів представлена сахарозою тож основне джерело вуглецю окрім соєвого білка і буде сахароза.

Визначення масової частки сахарози в поживному середовищі буде здійснюватися за методами з використанням поляриметричних трубок різної довжини.

Перед початком визначення розчин з проби освітлюють.. Як освітлювач в використовують в основному ацетат свинцю, що є розчином основної солі складу $2Pb(CH_3COO)_2 \cdot Pb(OH)_2$, який отримують при розчиненні свинцевого глету PbO в розчині оцтовосвинцевої солі $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$, взятих в еквімолекулярних кількостях.

Ацетат свинцю освітлює розчин, осаджуючи кислоти: щавелеву кислоту, оксикислоти, білки, сапоніни, барвні речовини, пектинові речовини, продукти розкладу редукувальних речовин, меланоїдини.

Як дуже сильний освітлювач (під час аналізів утфелю останьої кристалізації та меляси) застосовують основний нітрат свинцю, який утворюється з двох розчинів: Герлес I і Герлес II. Компоненти цих розчинів – $Pb(NO_3)_2$ і NaOH зберігаються окремо. Використовують кожного реагенту по 7-10 $см^3$. Для освітлення в розчин меляси додають в 3-4 прийоми рівними частинами: спочатку додають 2-3 $см^3$ розчину нітрату свинцю, а після перемішування – 2-3 $см^3$ розчину ідкого натру.

Концентрації розчинів Герлес I і Герлес II підбирають так, щоб утворився основний ацетат свинцю

Масову частку сахарози визначають масовим та об‘ємним методами. Беруть досліджуваний розчин, вимірюють температуру. У разі, якщо температура не відповідає 20 ^{o}C, розчин підігрівають на водяній бані. Потім досліджуваний розчин заливають у поляриметричні кювети на 100, 200 і 400 мм. У поляриметричній кімнаті при цілковитій темряві виставляється нуль прилада, потім опускаємо поляриметричну трубку в кювети відділення поляриметра і вимірюємо вміст сахарози. По нижній шкалі будуть цілі числа, по верхній визначаються десяті долі вмісту сахарози.

Результати визначень розраховують за формулою де 0,26 – ціна поділки поляриметра, г; $П_{200}$ – покази шкали поляриметра в полириметричній трубці на 200 мм; 26 – нормальна наважка продукту, 2.

Масову частку сахарози, %, обчислюють за формулою

$$Cx = \frac{0{,}26 \cdot П_{200} \cdot 100}{н} \%,$$

Одержані результати подвоюють, 400 мм – ділять на 2[70].

Визначення концентрації джерела азоту.

Метод Несслера базується на утворенні забарвленої важкорозчинної сполуки при взаємодії реактиву Несслера (K_2HgI_4) з аміаком в нейтральних або лужних розчинах: $2HgI_4 + NH3 + OH = NH_2Hg2I_3 + 5I_2 + H_2O$. Великого надлишку лугу слід уникати, оскільки може відбутися розкладання $NH_2Hg_2I_3$ з утворенням оксиду ртуті. Забарвлена сполука $NH_2Hg_2I_3$ схильна до утворення негативно заряджених колоїдних частинок. Для отримання рівномірної і стійкої суспензії в розчин вводять захисний колоїд – желатин, полівініловий спирт. При малих концентраціях аміаку колоїдні розчини мають жовте забарвлення, при збільшенні концентрації з’являється бурий відтінок. Отримання в ході аналізу колоїдних розчинів, здатних до коагуляції, знижує відтворюваність результатів аналізу, одержуваних методом Несслера. Для визначення аміаку до 1 мл супернатанту культуральної рідини додають 1 мл реактиву Несслера. Коефіцієнт екстинції вимірюють при довжині хвилі 400–425 нм. Концентрацію аміаку визначають за калібрувальним графіком. Фотометричному визначенню азоту методом Несслера заважають іони, що випадають в осад у лужному середовищі і

утворюють нерозчинні сполуки з йодид - іонами та іонами ртуті (магній, марганець, залізо, титан, сульфід-іони та ін.)[2].

Визначення активності кислотоутворення препарату.

Активність кислотоутворення препарату визначають титрометричним методом при вирощуванні біфідобактерій, що містяться у флаконі на модифікованому печінковому середовищі Блаурокка або середовищі Біфідум. У кожному досліді враховують показники із двох зразків препарату. До ліофілізованої біомаси, додають печінкове середовище Блаурокка або середовище Біфідум із розрахунку 1$см^3$на одну дозу препарату. Із двох зразків розведеного таким чином препарату переносять по 2,5 $см^3$мікробної зависі в пробірки (d - 2 см, h - 20 см) з 25 $см^3$ печінкового середовища і витримують протягом (72±1) год за температури (38±1) °С. Після цього визначають кислотність у кожній пробірці. Отриману суспензію у кількості 10 $см^3$ вносять у хімічну склянку місткістю 50 $см^3$ і титрують 0,1 М розчином гідроксиду натрію до pH (8,5±0,5). Показник pH контролюють потенціометрично. Кислотність у градусах Тернера визначають за формулою

°Т = V К • 10, де У — об'єм 0,1 М гідроксиду натрію, використаний на титрування, мм; К — коефіцієнт поправки до титру 0,1 М розчину гідроксиду натрію. Середнє значення активності кислотоутворення, отримане для двох зразків, має бути не нижче ніж 90 °Т. У разі отримання в одному із зразків показників кислотності нижче ніж 90 °Т дослід повторюють. Якщо при повторному дослідженні результат незадовільний, то серію препарату бракують.

Визначення антагоністичної активності

Антагоністичну активність виробничих штамів біфідобактерій можна також визначити за їхнього сумісного культивування з тест- культурами *Shigella flexneri* (2 штами) та *Shigella sonnei* (1 штам) на печінковому середовищі у пробірках. Кількість клітин тест- штамів, що вижили, через 72 год сумісного вирощування не повинна перевищувати 2 % кількості мікробних клітин цих тест-штамів у контрольних пробірках (без біфідобактерій)[17].

9.3.4 . Контроль готового продукту

Опис.

Порошок (пориста або кристалічна маса) бежевого кольору різної інтенсивності або бежевого кольору із сіруватим відтінком зі специфічним запахом і смаком. Визначають візуально та органолептично.

Розчинність.

У разі додавання води із розрахунку 1 см3 на одну дозу препарату протягом 5 хв утворюється гомогенна завись сірувато-бежевого кольору. Визначають візуально.

Прозорість

Завись має бути непрозорою. Розчин готують за (АНД) «Розчинність». Визначають візуально.

pH (5,5-6,5) Завись готують за АНД «Розчинність». Визначають згідно з ДФУ, вид. 1, р. 2.2.3, с. 17, потенціометрично.[75]

Визначення сипучості

Сипучість визначають за допомогою приладу ВП-12А. Для оцінки сипучості використовувють такі градації: 3,0-6,5 г / с - задовільна, 2,0-3,0 г / с - допустима, 1,0-2,0 г / с - погана, 0,3- 1,0 г / с - дуже погана. Насипну щільність розраховували як відношення маси порошку до займаному обсягу при вільному насипання (кг / м3).

Сипучість висловлюють як середню швидкість витікання матеріалу через отвір воронки певного діаметру. Сипучість визначали на вібраційному пристрої моделі ВП-12А, основною частиною якого є воронка з кутом конуса 60 ° і носиком, зрізаним під прямим кутом на відстані 3 мм від кінця конуса воронки. У воронку завантажували 10,0 г грануляту і засікають час висипання за секундоміром . сипучість характеризується швидкістю висипання Vc, яка розраховується за формулою : [75]

$$Vc = \frac{m}{t}$$

де:

Vc - сипучість, г / сек;

m - маса наважки, г;

t - час повного закінчення, секунди.

Втрати в масі під час сушіння

Втрати в масі під час сушіння не більше ніж 3,5 %. Визначають згідно з ДФУ, вид. 1, р. 2.2.32, с. 49. Суху розтерту біомасу із флакона у кількості 0,1 г сушать у вакуум-сушильній шафі за температури 58—62 °С і тиску від 1,5—2,5 кПа до постійної маси.

Визначення насипної маси

Насипну масу гранул вимірювали на приладі моделі 545Р-АК-3 (МЗТО). Насипну масу розраховували як відношення маси порошку до обсягом при вільному насипання без ущільнення. після вібраційного ущільнення визначали насипну масу з ущільненням.

Насипна маса (щільність) - це маса одиниці об'єму вільно насипаного матеріалу. Насипна маса залежить від розміру, форми частинок, вологості, сил зчеплення між частинками і є однією з характеристик для регулювання пігулок машин на середню масу таблетки.

Насипну масу визначали за формулою:[74]

$$\rho = \frac{m}{V} \text{ г/см}^3$$

де :

ρ - насипна маса;

m - маса грануляту, г;

V - об'єм грануляту в циліндрі після утруски см3.

Визначення вологовмісту

Дві наважки порошку масою 1-3 г, зважені з погрішністю ± 0,01г, помішують у заздалегідь висушені і зважені разом з кришками бюкси. Кожну наважку порошку сушать в сушильній шафі при температурі 100-105 °С до постійної маси.

Постійна маса вважається досягнутою, якщо різниця між двома подальшими зважуваннями після 30 хв. висушування і 30 хв. охолоджування в ексикаторі не перевищує 0,01 г.[48]

Вологість сировини (Х) у відсотках обчислюють за формулою:

$$X = \frac{(m - m_1) \times 100}{m}$$

де m – маса порошку до висушування, г;
m_1 - маса порошку після висушування, г.

За остаточний результат визначення беруть середнє арифметичне двох паралельних визначень, обчислених до десятих часток відсотка. Допустима розбіжність між результатами двох паралельних визначень не повинна перевищувати 0,5 %. Вологість порошків, що використовуються для виробництва таблеток, знаходиться в межах 3—5 %.[47]

Розділ 10. Автоматизація виробництва

Індивідуальне завдання на автоматизацію

Автоматизації підлягає ділянка зміжування біомаси з захисним середовищем вказана в табл 10.1

Таблиця 10.1

Структура ділянки виробництва, що підлягає автоматизації

№	Ділянка виробництва	Об`єкт автоматизації	Показники, що піддаються автоматизованому контролю та керуванню	Засоби автоматизації
1	Реактор для змішування біомаси та захисного середовища	Реактор для змішування біомаси та захисного середовища	Температура, Рівень рідини в апараті, Інтенсивність перемішування (кількість обертів мішалки за хвилину),	Контроль, регулювання

Загальна назва ділянки автоматизації - «Реактор для змішування»

10.1 Поставлення завдання на розробку системи автоматизації реактора.

Реактор для змішування, хоч і не складна система, однак вимагає автоматизації у лінії підтримки та контролю температури, інтенсивності перемішування та контроль рівнів заповнення: максимального та мінімального рівнів. Детальний опис параметрів описано у таблиці 1.2.

Таблиця 10.1.1

Завдання на розробку системи автоматизації(параметри)

Параметр, місце відбору імпульсу	Значення параметру допустимі відхилення	Система автоматизації		
		Вид системи автоматизації	Характер контролю, регулювання, управління	Додаткові вимоги
Температура середовища всередині реактора	10-45°С	Контроль, регулювання	Моніторинг	Керування аналоговим пневматичним клапаном (подачи пари у сорочну нагріву)
			Підтримання на заданому значенні	
			Сигналізація при значному відхиленні (світлова)	
Оберти перемішуючого пристрою	60-80 об/хв	Контроль, управління	Покази (об/хв)	Керування двигуном (аналогове)
			Пуск/стоп	
Рівень рідини	20-180 л	Контроль,	Моніторинг	Керування (дискретне) Вручну спуском рідини.
			Сигналізація (світлова)	

10.2. Опис функціональної схеми автоматизації

Контур 1. Температура культуральної рідини чи розчину вимірюється постійно за допомогою термоелектричного перетворювача (термопари) (поз. 1а). Сигнал від датчика температури у вигляді величини термоелектрорушійної сили (ТЕРС) надходить до нормуючого перетворювача (поз. 1б) і перетворюється в уніфікований електричний сигнал. Останній йде до ПЛК, конвертується у цифровий. При відхиленнях температури (підвищення) подача пари низького тиску в сорочку припиняється автоматично закриттям клапана. При зменшенні

температури-навпаки подається відкриттям клапана дозується виконавчим механізмом –автоматичним клапаном(поз. 1д). Уніфікований пневматичний сигнал до ВМ надходить з електро-пневмоперетворювача (поз. 1в).

Контур 2. Регулювання перемішуючого пристрою. При натисканні кнопки «Пуск» на моторі М (поз. 2а) відбувається перемішування культуральної рідини в апараті із заданою частотою обертів . Керування здійснюється за допомогою частотного перетворювача встановленого на двигуні мішалки. Воно може бути як по місцю на панелі управління на щиті біля ферментера або через мнемо-схему на ПК (панель дистанційного ручного керування (2 б)).

Контур 3. Максимальний рівень рідини в реакторі вимірюється ємнісним датчиком з електропередачою сигналу (поз. 3а). Дискретний сигнал від датчика подається на ПЛК і приводить у дію виконуючий механізм – перистальтичний насос з магнітним перетворювачем для контролю кількості подачі піногасника за допомогою обертів (М1) (поз. 3в). Уніфікований сигнал до ВМ надходить з панелі керування (поз. 3б).

Контур 4. Мінімальний рівень рідини вимірюється ємнісним датчиком з електропередачою сигналу (поз. 4а). Дискретний сигнал від датчика подається на ПЛК і приводить у дію виконуючий механізм, що блокує перемішувальний пристрій КМ1 (поз. 4в). Уніфікований сигнал до ВМ надходить з панелі керування (поз. 4б).

10.3. Специфікація засобів автоматизації

Таблиця 10.3.1

Позиція	Параметр	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Завод виготовлювач
1	2	3	4	5	6
3а, 4а	Рівень	По місцю	Ємнісний датчик для безконтактного контролю положення предметів, виготовлених з електропровідних і не електропровідних матеріалів, відстань спрацьовування до – 4…25 мм, максимальна частота 50 Гц, вихід - дискретний	EC3025 PPAPL	Carlo Gavazzi
3б,4б	Рівень	По місцю	Блок ручного управління імпульсними виконавчими механізмами, вхід – імпульсний, вихід – імпульсний, перехід ручний/автоматичний режим	БРУ5	ТОВ «Мікрол» Україна
3в,4в	Рівень	По місцю	Насос перистальтичний дозуючий з магнітним перетворювачем: дозування 0,1-9990 мл, щвидкість 0,1-100 об/хв	BT100-1F/	ТОВ «НОФЛИПАК»

Продовження таблиці 2.2

Продовження таблиці 2.2

1	2	3	4	5	6
1а	Температура	В реакторі	Температурний датчик з чутливим елементом опору. Діапазон температур -50-250 ^{0}С, матеріал чутливого елемента - мідь	ТСМ 50М	АТ. «Овен»
1	2	3	4	5	6
1б	Температура КР чи розчину	На щиті	Універсальний нормуючий перетворювач для встановлення в шкаф управління, вихідний сигнал термометра опору/термопари, вихідний сигнал – 4…20 мА, напруга живлення --= 24 В	НПТ1	АТ «Овен»
1в,	Температура КР чи розчину	На щиті	Електропневматичний перетворювач, вихідний сигнал – 4…20 мА, вихідний сигнал 20…100 кПа	2713-WP	Dwyer
1г,	Температура КР чи розчину	На щиті	Панель управління пневматична, для дистанційного ручного управління виконавчими механізмами, Ржив.= 140 кПа, управляючий сигнал у ручному режимі – 20…100 кПа	ПП12.2	Таурус, Росія
1д	Температура КР чи розчину	По місцю	Універсальний електро-пневматичний пускач для клапанів автоматичний з настройкою ступеня відкриття, вхідний сигнал: 4-20 мА	IP4000	Powerflow

Продовження таблиці 2.2

Завершення таблиці 2.2

2а	Оберти мішалки	По місцю	Частотний перетворювач для двигунів середньої потужності. Потужність 0.75кВт 1-ф/220 В, номінальний струм 4,2 В	VFD007EL21A	Delta Electronics
2б	Оберти мішалки	По місцю	Універсальний нормуючий перетворювач змінного струму у цифровий сигнал, діапазон робочого струму перетворення 0- 250 В, кількость каналів- 3, частота струму 50±0.5 Гц.	ПРН-3 УТС 045.00.00.00	ТОВ «НКП» «Укртанссигнал»

Висновок

- Було обрано та описано цільовий продукт біосинтезу як у вигляді АФІ так і у вигляді препарату.
- Було обгрунтована стадії технологічної схеми допоміжних робіт, підготовки посівного матеріалу, біосинтезу, стадій виділення і очищення і упаковки готової продукції
- На основі короткого економіного аналізу ринку була прорахована річна потреба у препараті Біфідумбактерин та розразована потужність йог овиробництва.
- Було розраховано та підбрано обладнання для виробничого біосинтезу, виділення і очищення та допоміжних робіт, що буде використовуватися у виробництві.
- Складено матеріальний баланс процесу.
- Розроблено апаратурні та технологічні схеми процесу одержання біфідумбактерину, з допомогою продуцента *Bifidobacterium bifidu 1*.
- Було розроблену схему автоматизації ділянки виробництва, а саме ділянки змышування быомаси з захисним середовищем.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Жиленкова О. Г.* Селекция производственно перспективных штаммов бифидобактерий, выделенных от детей: автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.02.03, 03.01.06. М., 2011. 154 с.
2. *Бондаренко В.М., Грачева Н.М.* Препараты пробиотики, пребиотики и синбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов .Микробиол. журнал. – 2003. – №7. – С.56-63.
3. Акоев Ю.С. Новый взгляд на дисбиозы у новорожденных детей / Ю.С. Акоев, Т.Б. Сенцова, Г.В. Яцын // Рос. педиатр. журн. — 2000. — № 5. — С. 13,14.
4. *Пат № 2515048. , RU МПК С 2, C12N1/20.* Способ культивирования бифидобактерий в молоке // *Кузин А. А., Кузина Д.А.* – Опубл. 10.05.2014. Бюл. №10
5. .Біфідумбактерин форте інструкція застосування [Електронний ресурс]. – довідник лікарських засобів . Режим доступу: https://www.vidal.ru/drugs/bifidumbacterin_forte__18724
6. Патент № 107738. Композиція інгредієнтів для культивування бактерій роду Bifidobacterium // Крупицька Л. О, Капрельянц Л. В, Труфкаті Л В.
7. Zarinah Zakaria1, Anis Amalinafitri Afandi1, Siti Nuriah Mohd Noor1, Napisah Hussin2 and Norshazila Shahidan1 // Prebiotic Activity Score Of Breadfruit Resistant Starch (Artocarpus altilis), Breadfruit Flour, And Inulin during In-Vitro Fermentation By Pure Cultures (Lactobacillus Plantarum, And Bifidobacterium Bifidum) // J. Agrobiotech.-2018-.Vol 9 - . N 1 P 123-127
8. Склад сої.[Електронний ресурс]: режим доступу https://agroscience.com.ua/plant/khimichnyi-sklad-zerna-soi
9. Хімічний склад клітин .[Електронний ресурс]: режим доступу http://um.co.ua/8/8-16/8-165334.html
10. Склад пептону .[Електронний ресурс]: режим доступу http://ddp.com.ua/pit_sredy/pepton_osnovnoj/

11. Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Смита, Дж. Стейли, С. Уильямса. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т.2: Пер. с англ. – М.: Мир, 1997. – 359
12. Parker M.Tom., Duergen I. Brian, M.T. Parker, B.I. Duergen. Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity. Vol. 2, Systematic bacteriology – Philadelphia. – 1990. – 1501 p.
13. Калюжна О. С. Вивчення О. С. Калюжна, Л. С. Стрельников, О. П. Стрілець антибіотикорезистентності пробіотичних штамів до антибіотиків та протигрибкових препаратів . Запорожский медицинский журнал. – 2008. – № 5. – С. 120–122.
14. Шендеров Б. А;Б. А. Шендеров Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т.3. Пробиотики и функциональное питание— М.: ГРАНТЪ, 2001. – 288 с.
15. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.:НУХТ, 2010. – 632с.
16. V. Lievin, I. Peiffer, S. Hudault Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity . [et al.] .Gut. — 2000. — Vol. 47. — P. 646—652.
17. Старовойтова С.О., Скроцька О.І., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П. Технологія пробіотиків. – К.: НУХТ, 2012. – С.27
18. Статистичний Збірник: Заклади охорони здоров`я та захворюваність населення України у 2018 р , Електронний ресурс: [режим доступу] http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2018/zb/06/zb_zoz_17.pdf
19. Інфекційна захворюваність населення України за формою № 1 за серпень та 12 місяців 2018-2109 року Електронний ресурс: [режим доступу] : https://www.phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/inshi-infekciyni-zakhvoryuvannya/infekciyna-zakhvoryuvanist-naselennya-ukraini
20. Альфлорекс капсули Електронний ресурс: [режим доступу] https://tabletki.ua/uk/brand/Альфлорекс/1011842/

21. Симбітер –М Електронний ресурс: [режим доступу] https://symbiter.ua/uk/multiprobiotics-symbiter-ua/symbiter-m-concentrated-ua.html
22. PRPBIOTIC-10 Електронний ресурс: [режим доступу] : https://www.proteinplus.com.ua/aktivnoe-dolgoletie/puritan-s-pride/probiotic-10-120-caps.html
23. Оптілакт. Електронний ресурс: [режим доступу] : https://tabletki.ua/uk/brand/Оптилакт/1015770/
24. Лациум. Електронний ресурс: [режим доступу] : https://liki.wiki/catalog/latsium#
25. Бифиформула. Електронний ресурс: [режим доступу] : https://aptekaeffect.com.ua/product_info.php/bififormula-naturalnyj-probiotik-bififormula-p-474
26. Полібактерин. Електронний ресурс: [режим доступу] : https://009.рф/instructions/primadofilus
27. Лінекс. Електронний ресурс: [режим доступу] : https://tabletki.ua/uk/Линекс/
28. Біфідумбактерин. Електронний ресурс: [режим доступу] : http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=35141
29. Лактобактерин. Електронний ресурс: [режим доступу] : https://tabletki.ua/uk/Лактобактерин-биофарма/
30. Лактіаліє. Електронний ресурс: [режим доступу] : https://tabletki.ua/uk/brand/Лактиале/1015410/pharmacy/
31. Ферментер на 100 л та 10 л Електронний ресурс [режим доступу] http://sartorius.com.ua/skorostnoj_fermenter___bioreaktor_biostat_d-dcu.html
32. Ферментер на 500 л[Електронний ресурс]: http://ecolabmicrotex.ru/shop/solida-biotech/sip-cip-pilotnye-bioreaktory-i-fermentery-20-500l/

33. Технологія мікробного синтезу лікарських засобів: Метод. Рекомендації до викон. курс. роботи для студ. Напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. форм. навч. / Уклад.: Т. П. Пирог, Ю.М Пенчук. – К.: НУХТ, 2011. – ст 17-19.
34. Пирог.Т.П , Ігнатова О.А Загальна біотехнологія: - К : НУХТ, 2009 – ст 47
35. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Метод. Рекомендації до викон. курс. роботи для студ. Напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. форм. навч. / Уклад.: Т. П. Пирог, Ю.В Карлаш, В.О Красінько . – К.: НУХТ, 2015. – 10 – 19 с.
36. Хлоратоїн. Електронний ресурс: [режим доступу] : https://prom.ua/p665834234-hlorantoin.html
37. Хлорне вапно . Електронний ресурс: [режим доступу] : https://prom.ua/p19361024-izvest-hlornaya-hlorne.html
38. Сода каустична, кальцинована. Електронний ресурс: [режим доступу] : https://officem.com.ua/promishlennaya-himiya
39. Лизовормин 3000. Електронний ресурс: [режим доступу] : https://prom.ua/p538216466-lizoformin-3000-dezinfitsiruyuschie.html
40. Маносепт Електронний ресурс: [режим доступу] : https://panigarmonika.com.ua/uk/obrobka-shkiri/713-manosept-ukrayina.html?utm_campaign=GMERCHANTCENTER&utm_source=google&utm_medium=Merchant&gclid=EAIaIQobChMIkcfSyteo5QIVB4GyCh1HBQnoEAYYASABEgI_SfD_BwE
41. Автоклав на 20 л. Електронний ресурс: https://zzlinker.en.made-in-china.com/product/ZyWmVkFcQohh/China-Lk-D14-Triumph-Dental-Autoclave-Cheap-Price-with-Auto-Drainage-System.html
42. Мікрофільтраційна ручна установка. Електронний ресурс: [режим доступу] : https://www.thermofisher.com/ua/en/home/life-science/lab-plasticware-supplies/filtration/sterile-filtration.html

43. Данилов І, П, Апарати мікробіологічної промисловості: - К :КПІ, 2008 – ст 48-80.

44. Центрифуга фільтрувальна. [Електронний ресурс] : режим доступу https://studall.org/all-32438.html

45. Центрифуга проточна. [Електронний ресурс] : режим доступу https://bio-rus.ru/oborudovanie/protochnyie-czentrifugi/czentrifugi-protochnyie-(-germaniya,-sera)/pilotnaya-protochnaya-czentrifuga-cepa-z-41.html

46. Центрифуга декантантна. [Електронний ресурс] : режим доступу https://studopedia.com.ua/1_51106_budova-tsentrifug.html

47. Сепаратор . [Електронний ресурс] : режим доступу https://damilk.com.ua/ua/novosti/separator-dlya-moloka-v-domashnih-usloviyah/

48. Ультрафільтраційна установка. [Електронний ресурс] : режим доступу https://aw-therm.com.ua/ultrafioletovoe-obezzarazhivanie-vody/

49. Полісахариди [Електронний ресурс] : режим https://www.google.com.ua/search?q=%D0%BF%D0%BE%D0%BB%D1%96%D1%81%D0%B0%D1%85%D0%B0%D1%80%D0%B8%D0%B4%D0%B8&ie=&oe

50. Гліцерин [Електронний ресурс] : режим https://uk.wikipedia.org/wiki/Гліцерин

51. ПГА [Електронний ресурс] : режим https://co2-extract.ru/product_info.php?products_id=347

52. Желатин [Електронний ресурс] : режим https://uk.wikipedia.org/wiki/Желатин

53. ДМСО [Електронний ресурс] : режим https://www.obozrevatel.com/health/lekarstva/dimetilsulfoksid.htm

54. Особливості біфідобактерій [Електронний ресурс] : режим доступу https://uk.wikipedia.org/wiki/Біфідобактерії

55. О. В. Басюл, Г. В. Ямборко, В. О. Іваниця. Вплив складу захисних середовищ на зберігання, життєздатність та біотехнологічні властивості ліофілізованих бактерій Lactobacillus plantum//–. ´.Вісник ОНУ.-2014. –, N 19. Том 34 – . Ст . 10-13.

56. Характеристика вакуумного сушіння. [Електронний ресурс] : режим доступу https://uk.wikipedia.org/wiki/Вакуумне_сушіння

57. Характиеристика ліофілізації. [Електронний ресурс] : режим доступу https://uk.wikipedia.org/wiki/Ліофілізація

58. Реактор на 63 літри. Електронний ресурс: [режим доступу] : https://promvit.com.ua/reaktor-mobilnyj-rsp-63-vo-vzryvozashhishhennom-ispolnenii-gmp/

59. Реактор на 10 літрів. Електронний ресурс: [режим доступу] : https://perryvidex.prom.ua/p900516672-reaktor-nerzhaveyuschej-stali.html

60. Реактор на 150 літрів . Електронний ресурс: [режим доступу] : https://perryvidex.prom.ua/p900516663-reaktor-nerzhaveyuschej-stali.html

61. Дозатори. Електронний ресурс: [режим доступу] : https://asvik.kiev.ua/

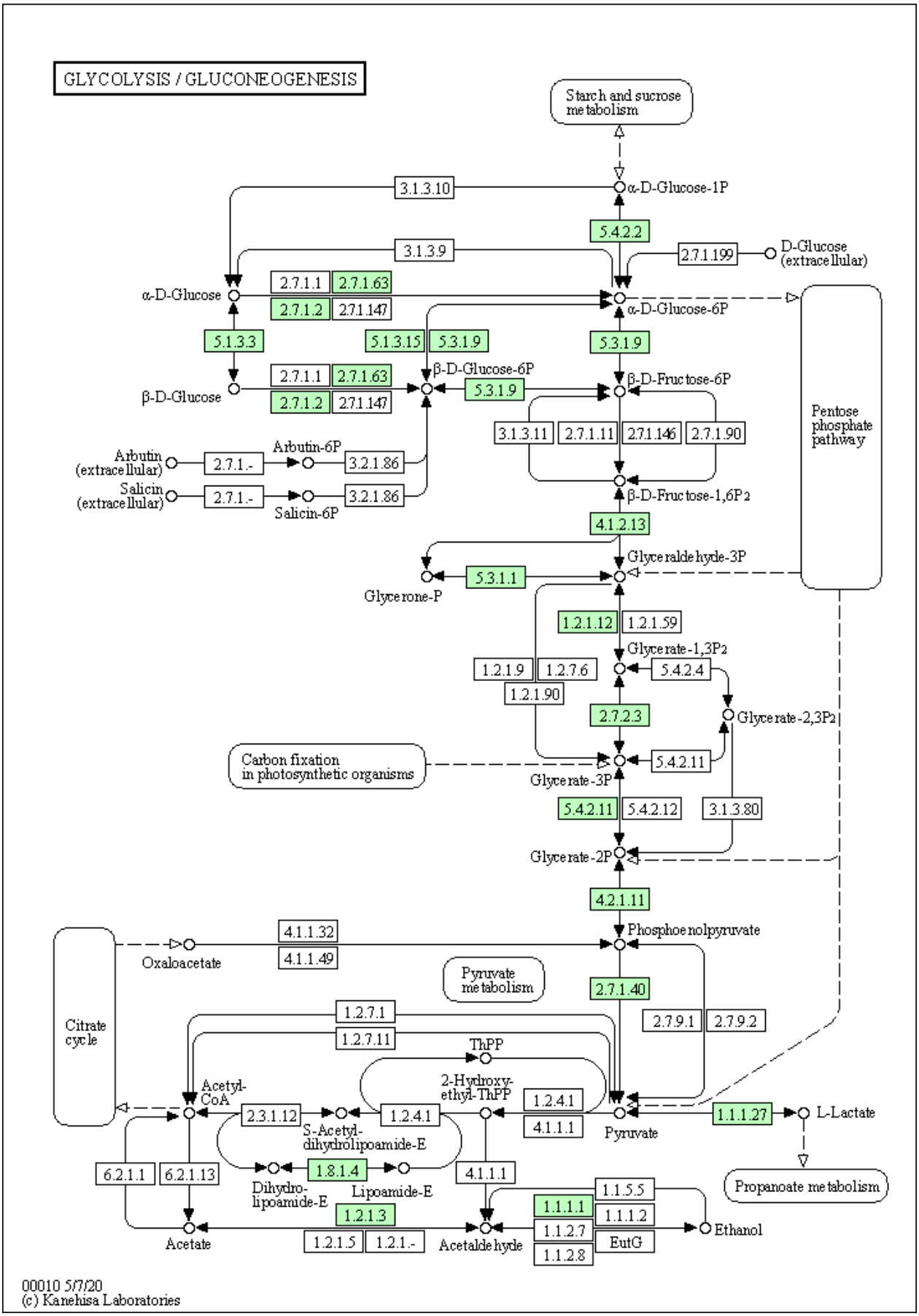
62. Насоси. Електронний ресурс: [режим доступу] :https://vaterpass.ua/seriya_psf

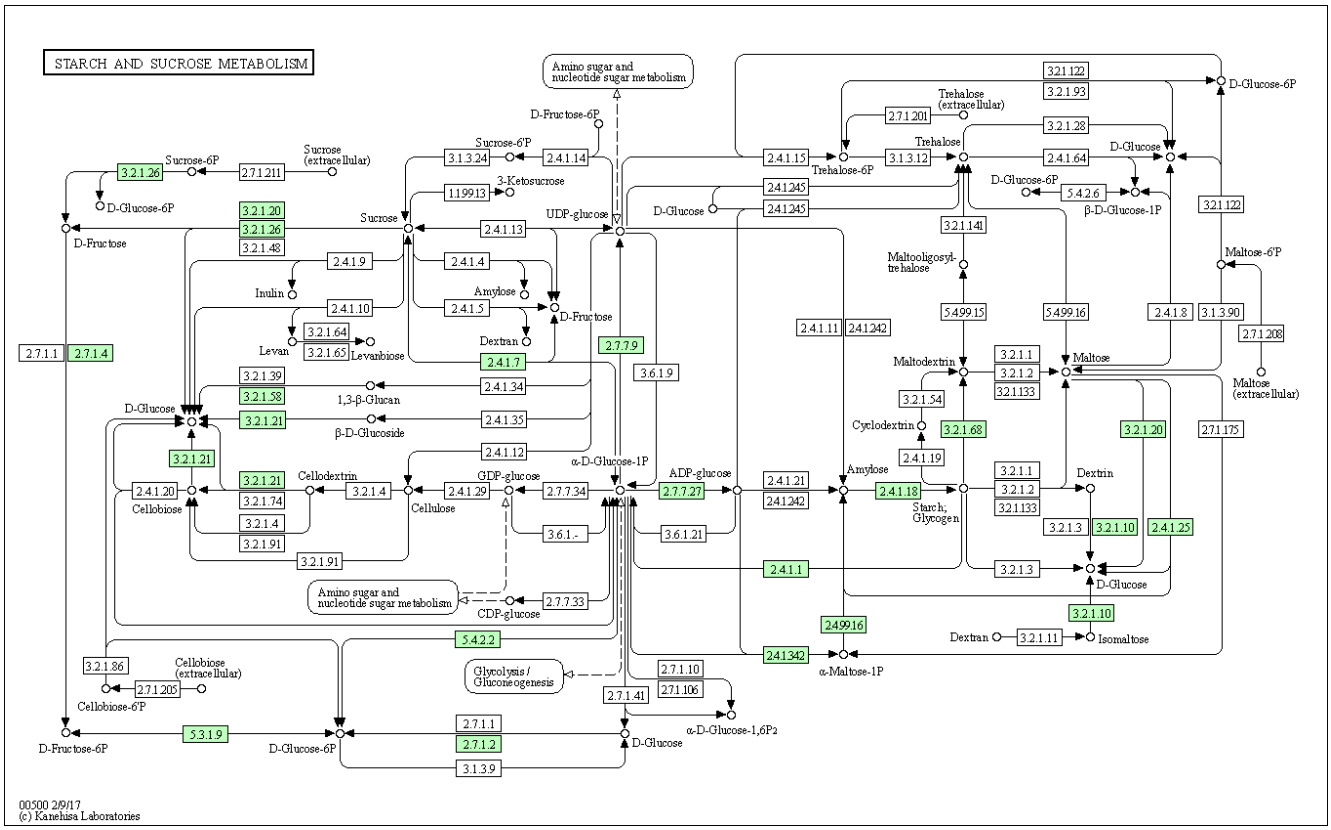
63. Фільтри Електронний ресурс: [режим доступу] : https://epicentrk.ua/ua/shop/blok-podgotovki-vozdukha-s-manometrom-ottensten-1-4-20206288.html?gclid=CjwKCAjwkun1BRAIEiwA2mJRWVgP2SjfMghbcthYOyjDH2wLq5H1rf9siPI4k7iQ5Gi7-HKti9cnYxoCelgQAvD_BwE

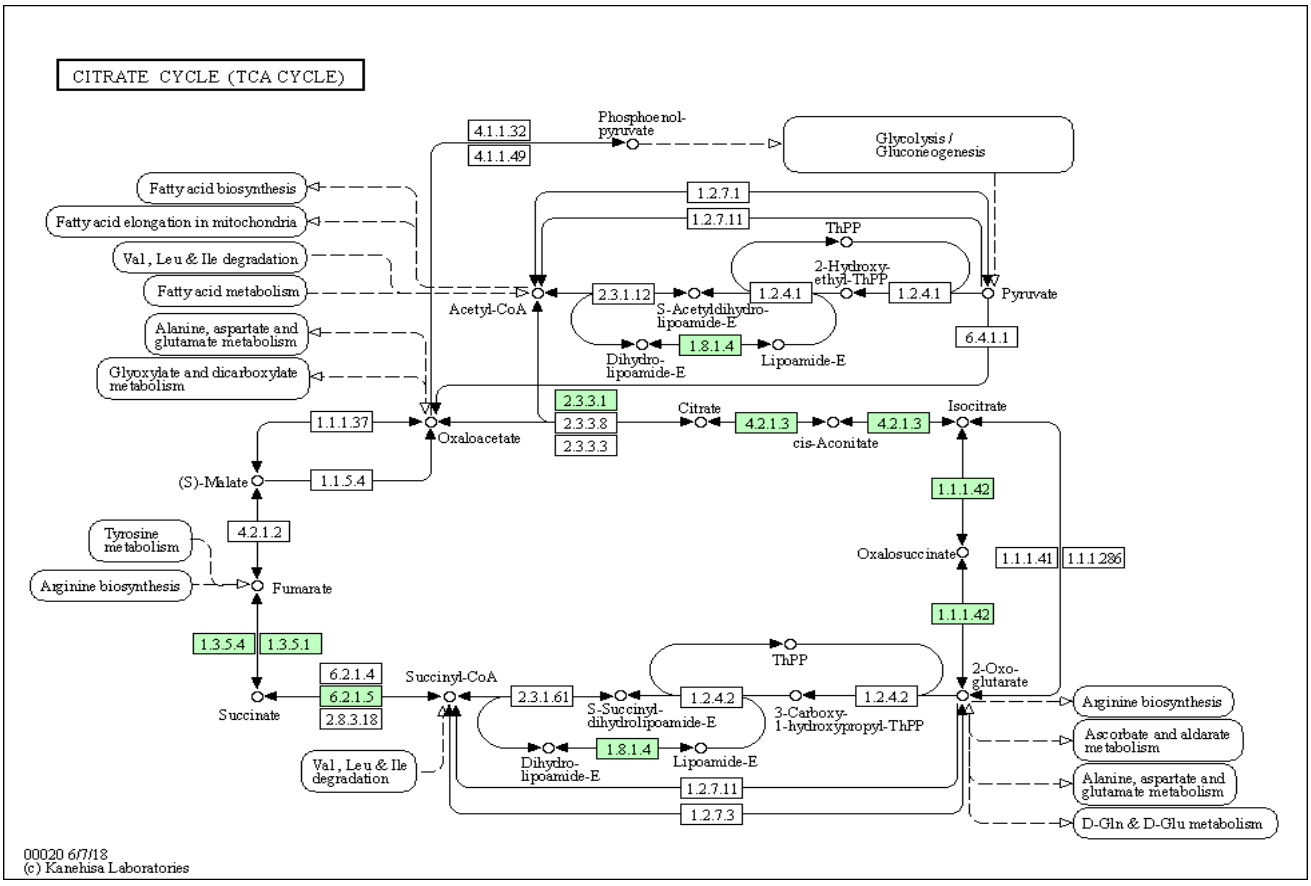
64. Реактор на 100 л . [Електронний ресурс] : режим доступу https://promvit.com.ua/reaktor-100-l-dlya-prigotovleniya-farmacevticheskix-rastvorov-i-suspenzij/

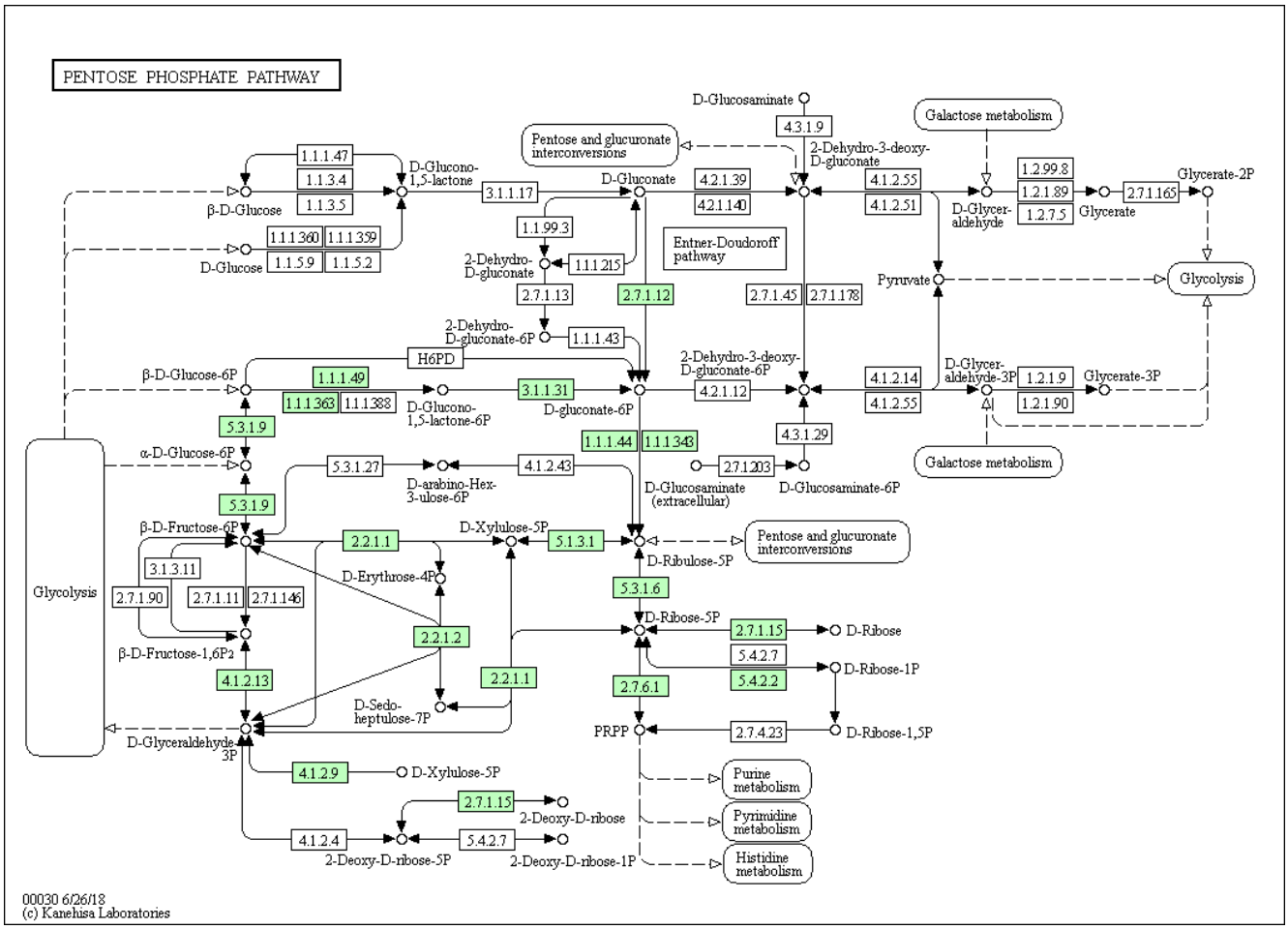
65. Центрифуга на 70 л . [Електронний ресурс] : режим доступу https://biotechno.ru/catalog/filtruyushchie-tsentrifugi/pilotnye-filtruyushchie-tsentrifugi-cepa-tz/
66. Реактор на 200 л . [Електронний ресурс] : режим доступу https://midas-a.ub.ua/goods/view/679976/all/vakuum-viparniy-aparat-mzs-320/
67. Ліофілізатор на 200 кг продукта . [Електронний ресурс] : режим доступу https://russian.alibaba.com/product-detail/fruit-dnd-vegetable-freeze-dryer-coffee-vacuum-liofilizador-lyophilizer-for-china-62371104270.html?spm=a2700.8699010.normalList.94.2f365120rRsJr7
68. Пакувальний автомат . [Електронний ресурс] : режим доступу https://prom.ua/p1024854834-pakuvalnij-avtomat-hualian.html
69. Насос [Електронний ресурс] : режим https://vaterpass.com.ua/catalog/peristalticheskie_nasosyi/seriya_psf/rotho_psf2
70. Загальні технології харчової промисловості: Лабораторний практикум . для студентів напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія» за освітньо-кваліфікаційним рівнем «бакалавр» денної форми навчання / Уклад.:. С.П. Олянська, О.В. Грабовська, О.М. Молодницька – К.: НУХТ, 2014. – ст 15-20.
71. Біфідобактерії мікроскомія по Граму.[Електронний ресурс]: режим доступу: http://textbookofbacteriology.net/normalflora_1.html
72. Фарбування за Грамом [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://studopedia.com.ua/1_229434_tehnika-farbuvannya-za-gramom.html
73. Концентрація біомаси [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://studfiles.net/preview/5194349/page:18/
74. *М.И. Демешева, Л.Н. Мезенцева, Т.Д. Лимарева, Е.В. Князюк* . ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОИЗВОДСТВА БИФИДУМБАКТЕРИНА . СИБИРСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ № 2`2009 (выпуск 2)
75. Технологія пробіотиків: Підруч. / *С.О. Старовойтова, О.І. Скроцька, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог*. — К.: НУХТ, 2012. — 318 с.

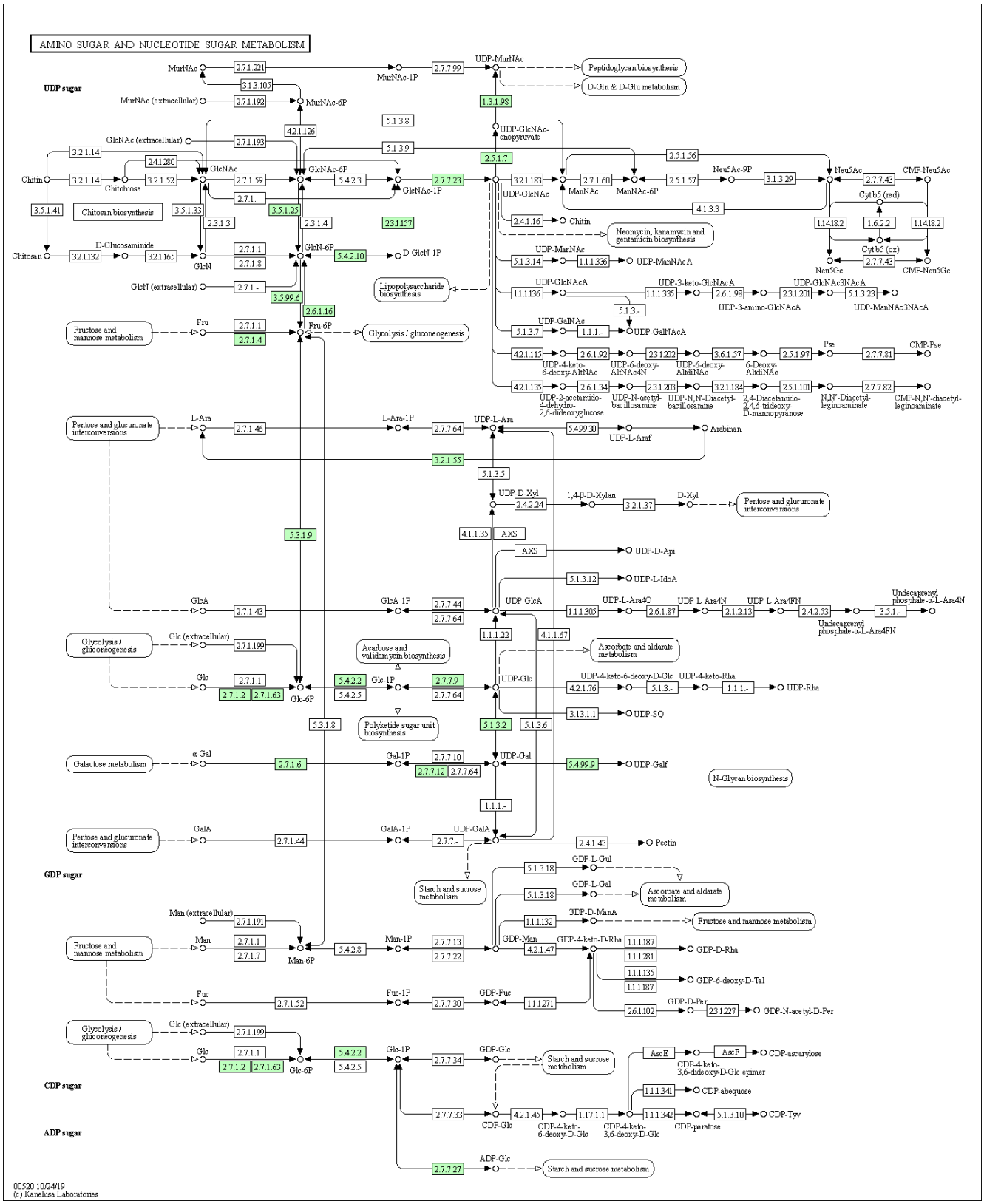
Додаток 1

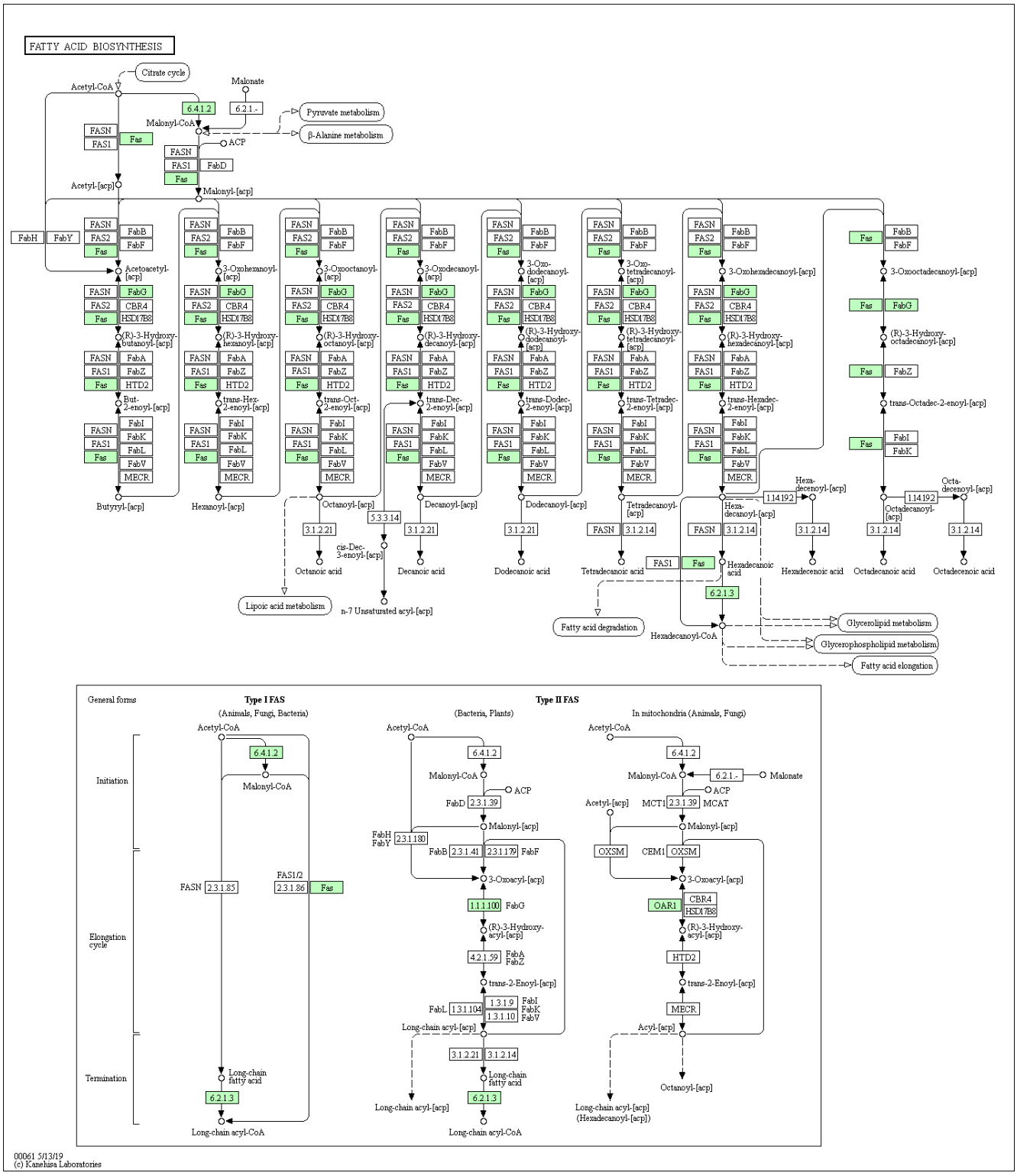

GLYCOLYSIS / GLUCONEOGENESIS
Starch and sucrose metabolism
α-D-Glucose-1P
D-Glucose (extracellular)
α-D-Glucose
α-D-Glucose-6P
β-D-Glucose
β-D-Glucose-6P
β-D-Fructose-6P
Pentose phosphate pathway
Arbutin (extracellular)
Arbutin-6P
Salicin (extracellular)
Salicin-6P
β-D-Fructose-1,6P2
Glyceraldehyde-3P
Glycerone-P
Glycerate-1,3P2
Glycerate-2,3P2
Carbon fixation in photosynthetic organisms
Glycerate-3P
Glycerate-2P
Phosphoenolpyruvate
Oxaloacetate
Pyruvate metabolism
Citrate cycle
ThPP
2-Hydroxy-ethyl-ThPP
Acetyl-CoA
S-Acetyl-dihydrolipoamide-E
Pyruvate
L-Lactate
Propanoate metabolism
Dihydro-lipoamide-E
Lipoamide-E
Acetate
Acetaldehyde
Ethanol
EutG
00010 5/7/20
(c) Kanehisa Laboratories

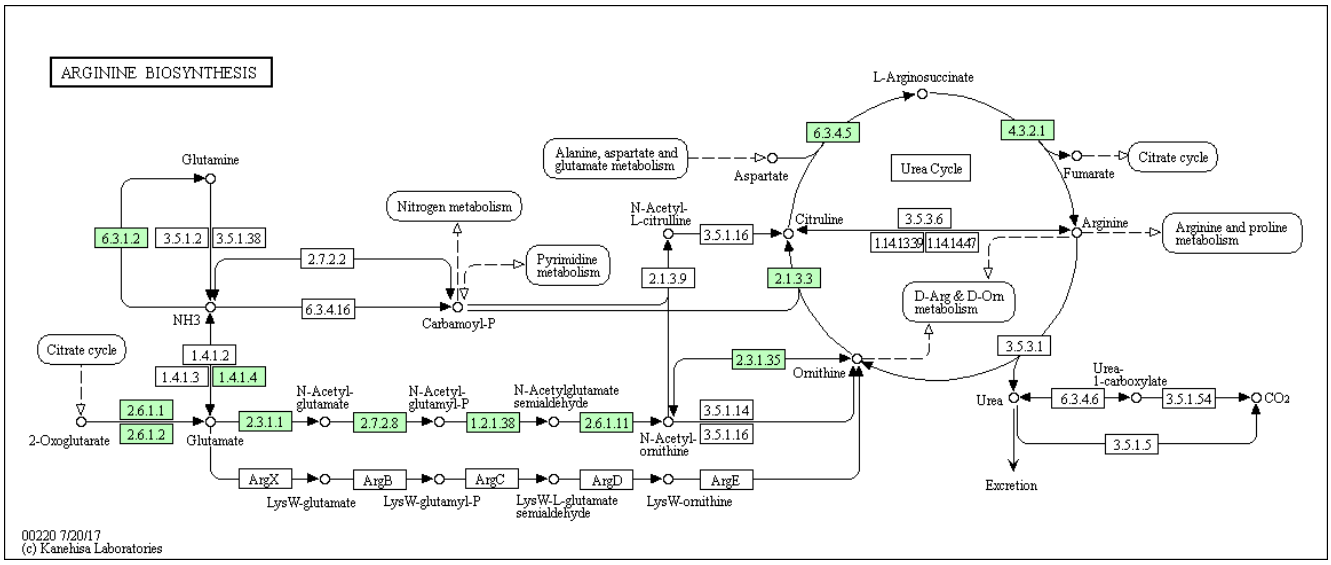

STARCH AND SUCROSE METABOLISM
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
D-Fructose-6P
Sucrose-6P
Sucrose (extracellular)
Sucrose
3-Ketosucrose
UDP-glucose
D-Glucose-6P
D-Fructose
Inulin
Amylose
Levan
Levanbiose
Dextran
1,3-β-Glucan
β-D-Glucoside
D-Glucose
Cellodextrin
Cellobiose
Cellulose
GDP-glucose
α-D-Glucose-1P
ADP-glucose
Amylose
Starch; Glycogen
Trehalose (extracellular)
Trehalose
Trehalose-6P
D-Glucose
β-D-Glucose-1P
Maltooligosyl-trehalose
Maltodextrin
Maltose
Maltose (extracellular)
Maltose-6P
Cyclodextrin
Dextrin
Isomaltose
α-Maltose-1P
Cellobiose (extracellular)
Cellobiose-6P
Glycolysis / Gluconeogenesis
α-D-Glucose-1,6P2
CDP-glucose
00500 2/9/17
(c) Kanehisa Laboratories

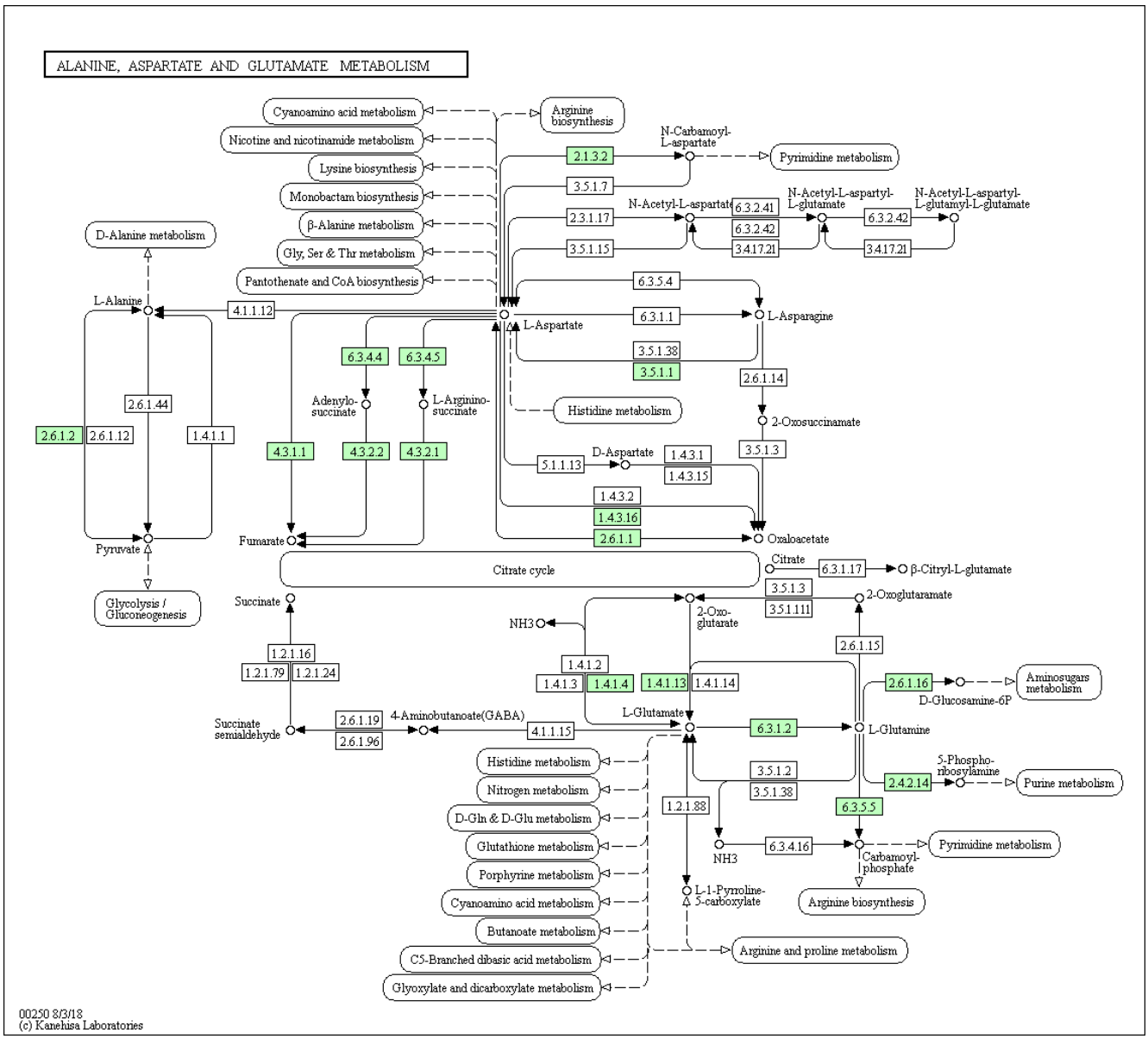

CITRATE CYCLE (TCA CYCLE)
4.1.1.32
4.1.1.49
Phosphoenol-pyruvate
Glycolysis / Gluconeogenesis
Fatty acid biosynthesis
Fatty acid elongation in mitochondria
Val, Leu & Ile degradation
Fatty acid metabolism
Alanine, aspartate and glutamate metabolism
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism
1.2.7.1
1.2.7.11
ThPP
2-Hydroxy-ethyl-ThPP
1.2.4.1
Pyruvate
Acetyl-CoA
2.3.1.12
S-Acetyldihydro-lipoamide-E
1.2.4.1
1.8.1.4
Dihydro-lipoamide-E
Lipoamide-E
6.4.1.1
2.3.3.1
2.3.3.8
2.3.3.3
Citrate
4.2.1.3
cis-Aconitate
4.2.1.3
Isocitrate
1.1.1.37
Oxaloacetate
(S)-Malate
1.1.5.4
1.1.1.42
Tyrosine metabolism
4.2.1.2
Arginine biosynthesis
Fumarate
Oxalosuccinate
1.1.1.41
1.1.1.286
1.1.1.42
1.3.5.4
1.3.5.1
ThPP
6.2.1.4
6.2.1.5
2.8.3.18
Succinyl-CoA
Succinate
2.3.1.61
S-Succinyl-dihydrolipoamide-E
1.2.4.2
3-Carboxy-1-hydroxypropyl-ThPP
1.2.4.2
2-Oxo-glutarate
Arginine biosynthesis
Ascorbate and aldarate metabolism
Alanine, aspartate and glutamate metabolism
D-Gln & D-Glu metabolism
Val, Leu & Ile degradation
1.8.1.4
Dihydro-lipoamide-E
Lipoamide-E
1.2.7.11
1.2.7.3
00020 6/7/18
(c) Kanehisa Laboratories

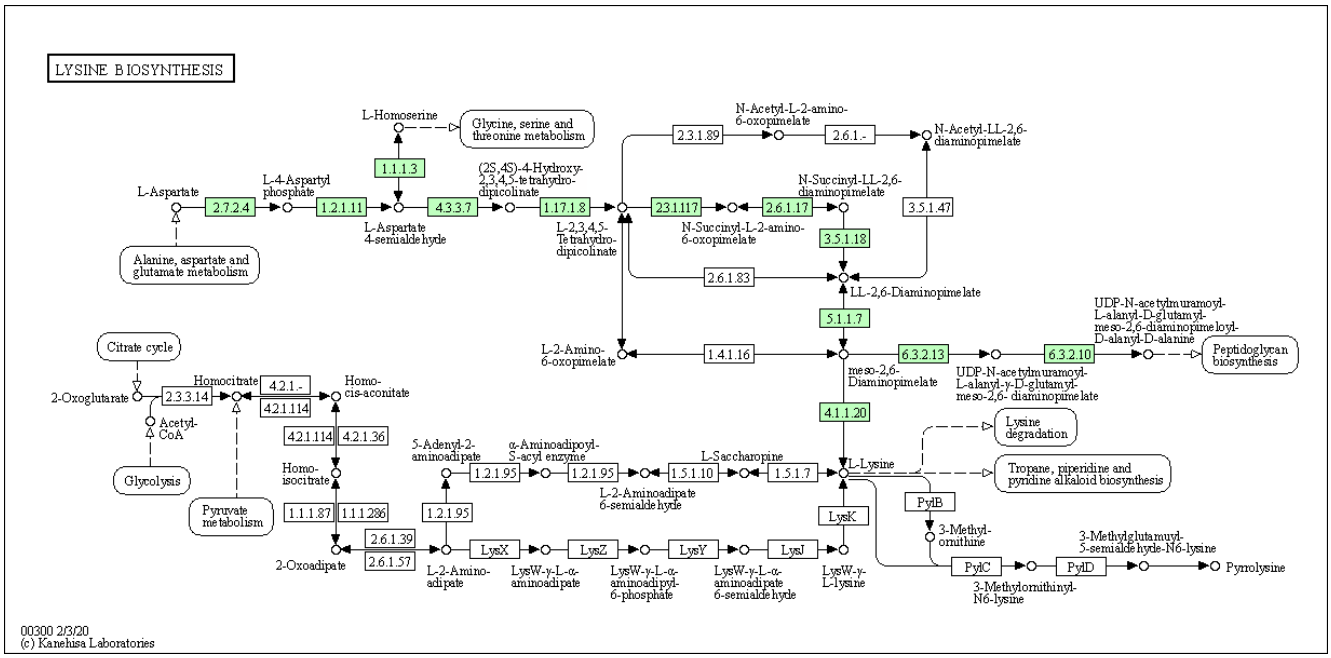

PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY
D-Glucosaminate
4.3.1.9
Galactose metabolism
Pentose and glucuronate interconversions
2-Dehydro-3-deoxy-D-gluconate
1.2.99.8
1.2.1.89
1.2.7.5
Glycerate-2P
2.7.1.165
Glycerate
D-Glycer-aldehyde
1.1.1.47
1.1.3.4
1.1.3.5
D-Glucono-1,5-lactone
3.1.1.17
D-Gluconate
4.2.1.39
4.2.1.140
4.1.2.55
4.1.2.51
β-D-Glucose
1.1.1.360
1.1.1.359
1.1.5.9
1.1.5.2
D-Glucose
1.1.99.3
2-Dehydro-D-gluconate
1.1.1.215
Entner-Doudoroff pathway
Pyruvate
Glycolysis
2.7.1.13
2.7.1.12
2.7.1.45
2.7.1.178
2-Dehydro-D-gluconate-6P
1.1.1.43
H6PD
β-D-Glucose-6P
1.1.1.49
1.1.1.363
1.1.1.388
D-Glucono-1,5-lactone-6P
3.1.1.31
D-gluconate-6P
2-Dehydro-3-deoxy-D-gluconate-6P
4.2.1.12
4.1.2.14
4.1.2.55
D-Glycer-aldehyde-3P
1.2.1.9
1.2.1.90
Glycerate-3P
5.3.1.9
1.1.1.44
1.1.1.343
4.3.1.29
α-D-Glucose-6P
5.3.1.27
4.1.2.43
D-arabino-Hex-3-ulose-6P
2.7.1.203
D-Glucosaminate (extracellular)
D-Glucosaminate-6P
Galactose metabolism
5.3.1.9
β-D-Fructose-6P
2.2.1.1
D-Xylulose-5P
5.1.3.1
Pentose and glucuronate interconversions
D-Ribulose-5P
3.1.3.11
D-Erythrose-4P
5.3.1.6
Glycolysis
2.7.1.90
2.7.1.11
2.7.1.146
D-Ribose-5P
2.7.1.15
D-Ribose
2.2.1.2
5.4.2.7
β-D-Fructose-1,6P2
D-Ribose-1P
5.4.2.2
4.1.2.13
2.2.1.1
2.7.6.1
D-Sedo-heptulose-7P
PRPP
2.7.4.23
D-Ribose-1,5P
D-Glyceraldehyde-3P
4.1.2.9
D-Xylulose-5P
Purine metabolism
2.7.1.15
2-Deoxy-D-ribose
Pyrimidine metabolism
4.1.2.4
5.4.2.7
2-Deoxy-D-ribose-5P
2-Deoxy-D-ribose-1P
Histidine metabolism
00030 6/26/18
(c) Kanehisa Laboratories

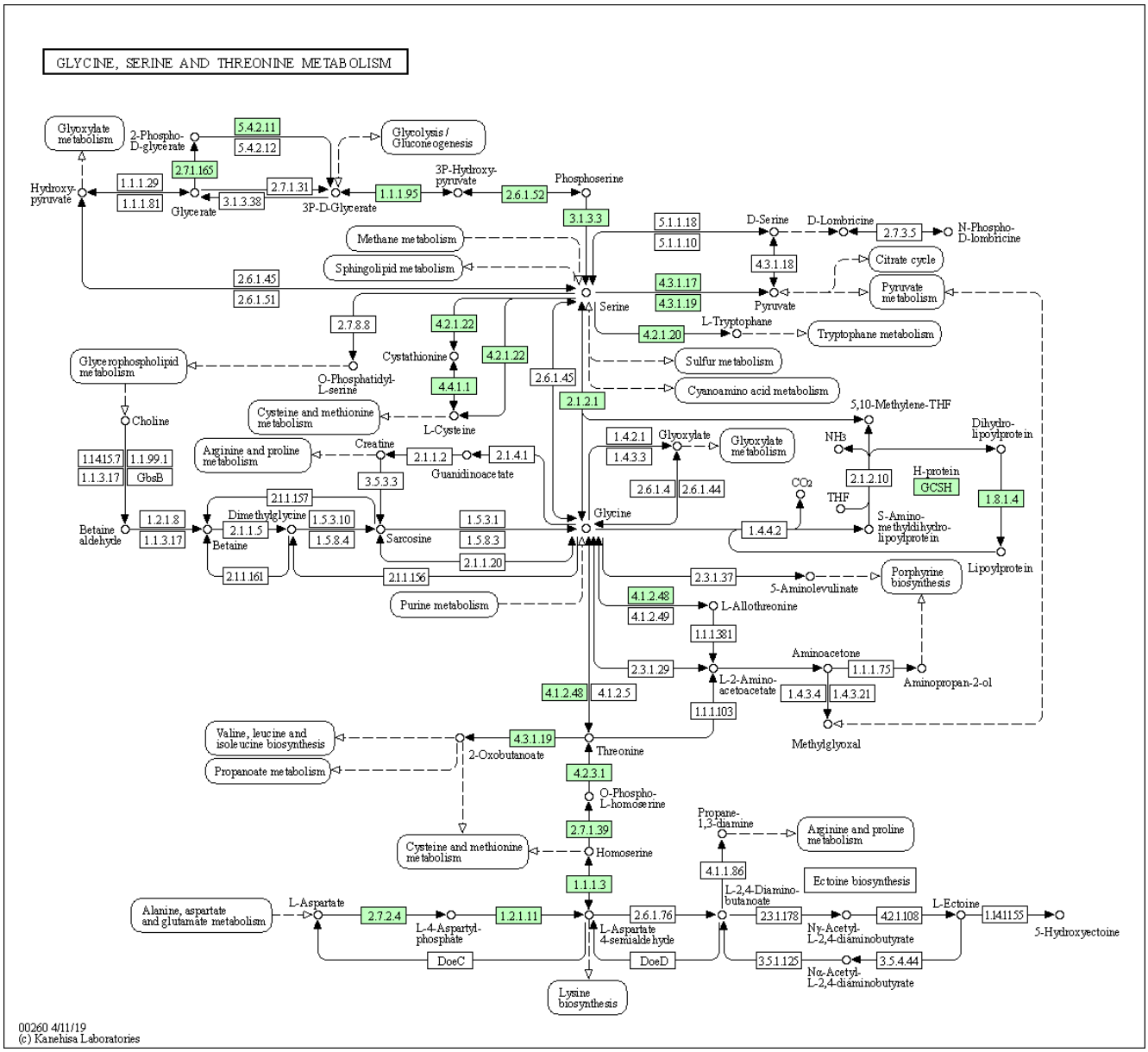

AMINO SUGAR AND NUCLEOTIDE SUGAR METABOLISM
UDP sugar
GDP sugar
CDP sugar
ADP sugar
MurNAc
MurNAc-1P
UDP-MurNAc
Peptidoglycan biosynthesis
D-Gln & D-Glu metabolism
MurNAc (extracellular)
MurNAc-6P
UDP-GlcNAc-enopyruvate
GlcNAc (extracellular)
Chitin
Chitobiose
GlcNAc
GlcNAc-6P
GlcNAc-1P
UDP-GlcNAc
ManNAc
ManNAc-6P
Neu5Ac-9P
Neu5Ac
CMP-Neu5Ac
Cytb5 (red)
Cytb5 (ox)
Chitosan biosynthesis
Chitosan
D-Glucosaminide
GlcN
GlcN-6P
D-GlcN-1P
GlcN (extracellular)
Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis
UDP-ManNAc
UDP-ManNAcA
Neu5Gc
CMP-Neu5Gc
Lipopolysaccharide biosynthesis
UDP-GlcNAcA
UDP-3-keto-GlcNAcA
UDP-3-amino-GlcNAcA
UDP-GlcNAc3NAcA
UDP-ManNAc3NAcA
Fructose and mannose metabolism
Fru
Fru-6P
Glycolysis / gluconeogenesis
UDP-GalNAc
UDP-GalNAcA
UDP-4-keto-6-deoxy-AltNAc
UDP-6-deoxy-AltNAc-4N
UDP-6-deoxy-AltdiNAc
6-Deoxy-AltdiNAc
Pse
CMP-Pse
UDP-2-acetamido-4-dehydro-2,6-dideoxyglucose
UDP-N-acetyl-bacillosamine
UDP-N,N'-Diacetyl-bacillosamine
2,4-Diacetamido-2,4,6-trideoxy-D-mannopyranose
N,N'-Diacetyl-leginosaminate
CMP-N,N'-diacetyl-leginosaminate
Pentose and glucuronate interconversions
L-Ara
L-Ara-1P
UDP-L-Ara
UDP-L-Araf
Arabinan
UDP-D-Xyl
1,4-β-D-Xylan
D-Xyl
AXS
UDP-D-Api
UDP-L-IdoA
GlcA
GlcA-1P
UDP-GlcA
UDP-L-Ara4O
UDP-L-Ara4N
UDP-L-Ara4FN
Undecaprenyl phosphate-α-L-Ara4N
Undecaprenyl phosphate-α-L-Ara4FN
Glycolysis / gluconeogenesis
Glc (extracellular)
Acarbose and validamycin biosynthesis
Ascorbate and aldarate metabolism
Glc
Glc-6P
Glc-1P
UDP-Glc
UDP-4-keto-6-deoxy-D-Glc
UDP-4-keto-Rha
UDP-Rha
UDP-SQ
Polyketide sugar unit biosynthesis
Galactose metabolism
α-Gal
Gal-1P
UDP-Gal
UDP-Galf
N-Glycan biosynthesis
GalA
GalA-1P
UDP-GalA
Pectin
GDP-L-Gul
GDP-L-Gal
Starch and sucrose metabolism
Ascorbate and aldarate metabolism
Man (extracellular)
Man
Man-6P
Man-1P
GDP-Man
GDP-D-ManA
Fructose and mannose metabolism
GDP-4-keto-D-Rha
GDP-D-Rha
GDP-6-deoxy-D-Tal
Fuc
Fuc-1P
GDP-Fuc
GDP-D-Per
GDP-N-acetyl-D-Per
CDP-Glc
CDP-4-keto-6-deoxy-D-Glc
CDP-4-keto-3,6-deoxy-D-Glc
CDP-paratose
CDP-ascarylose
CDP-4-keto-3,6-dideoxy-D-Glc epimer
CDP-abequose
CDP-Tyv
ADP-Glc
00520 10/24/19
(c) Kanehisa Laboratories

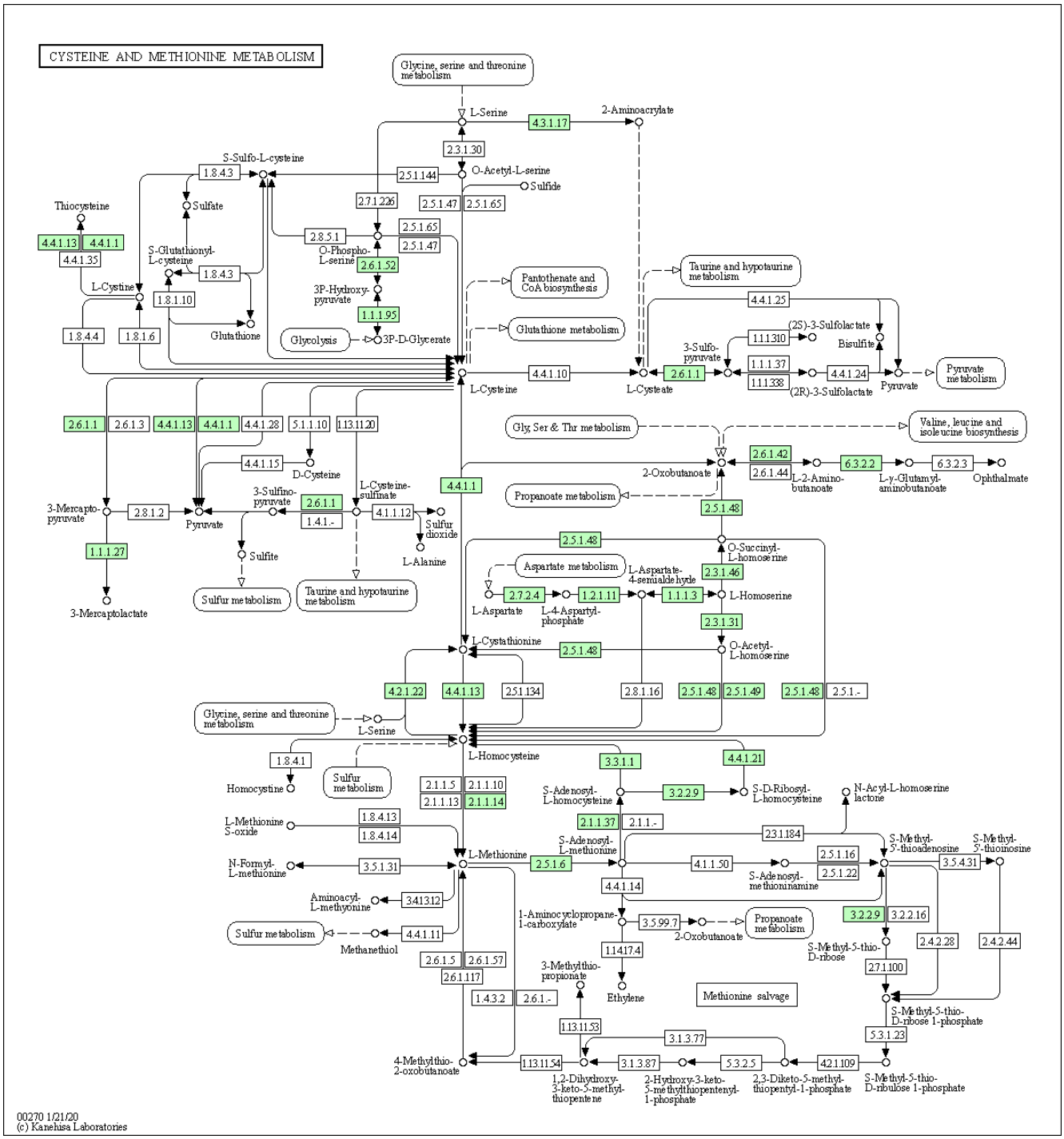

FATTY ACID BIOSYNTHESIS
Citrate cycle
Acetyl-CoA
Malonate
Malonyl-CoA
Pyruvate metabolism
β-Alanine metabolism
ACP
Acetyl-[acp]
Malonyl-[acp]
Acetoacetyl-[acp]
3-Oxohexanoyl-[acp]
3-Oxooctanoyl-[acp]
3-Oxodecanoyl-[acp]
3-Oxo-dodecanoyl-[acp]
3-Oxo-tetradecanoyl-[acp]
3-Oxohexadecanoyl-[acp]
3-Oxooctadecanoyl-[acp]
(R)-3-Hydroxy-butanoyl-[acp]
(R)-3-Hydroxy-hexanoyl-[acp]
(R)-3-Hydroxy-octanoyl-[acp]
(R)-3-Hydroxy-decanoyl-[acp]
(R)-3-Hydroxy-dodecanoyl-[acp]
(R)-3-Hydroxy-tetradecanoyl-[acp]
(R)-3-Hydroxy-hexadecanoyl-[acp]
(R)-3-Hydroxy-octadecanoyl-[acp]
But-2-enoyl-[acp]
trans-Hex-2-enoyl-[acp]
trans-Oct-2-enoyl-[acp]
trans-Dec-2-enoyl-[acp]
trans-Dodec-2-enoyl-[acp]
trans-Tetradec-2-enoyl-[acp]
trans-Hexadec-2-enoyl-[acp]
trans-Octadec-2-enoyl-[acp]
Butyryl-[acp]
Hexanoyl-[acp]
Octanoyl-[acp]
Decanoyl-[acp]
Dodecanoyl-[acp]
Tetradecanoyl-[acp]
Hexadecanoyl-[acp]
Octadecanoyl-[acp]
Hexa-decenoyl-[acp]
Octa-decenoyl-[acp]
cis-Dec-3-enoyl-[acp]
Octanoic acid
Decanoic acid
Dodecanoic acid
Tetradecanoic acid
Hexadecanoic acid
Hexadecenoic acid
Octadecanoic acid
Octadecenoic acid
Lipoic acid metabolism
n-7 Unsaturated acyl-[acp]
Fatty acid degradation
Hexadecanoyl-CoA
Glycerolipid metabolism
Glycerophospholipid metabolism
Fatty acid elongation
General forms
Type I FAS
(Animals, Fungi, Bacteria)
Type II FAS
(Bacteria, Plants)
In mitochondria (Animals, Fungi)
Initiation
Elongation cycle
Termination
Long-chain fatty acid
Long-chain acyl-CoA
Long-chain acyl-[acp]
Acyl-[acp]
Long-chain acyl-[acp] (Hexadecanoyl-[acp])
trans-2-Enoyl-[acp]
(R)-3-Hydroxy-acyl-[acp]
3-Oxoacyl-[acp]
00061 5/13/19
(c) Kanehisa Laboratories

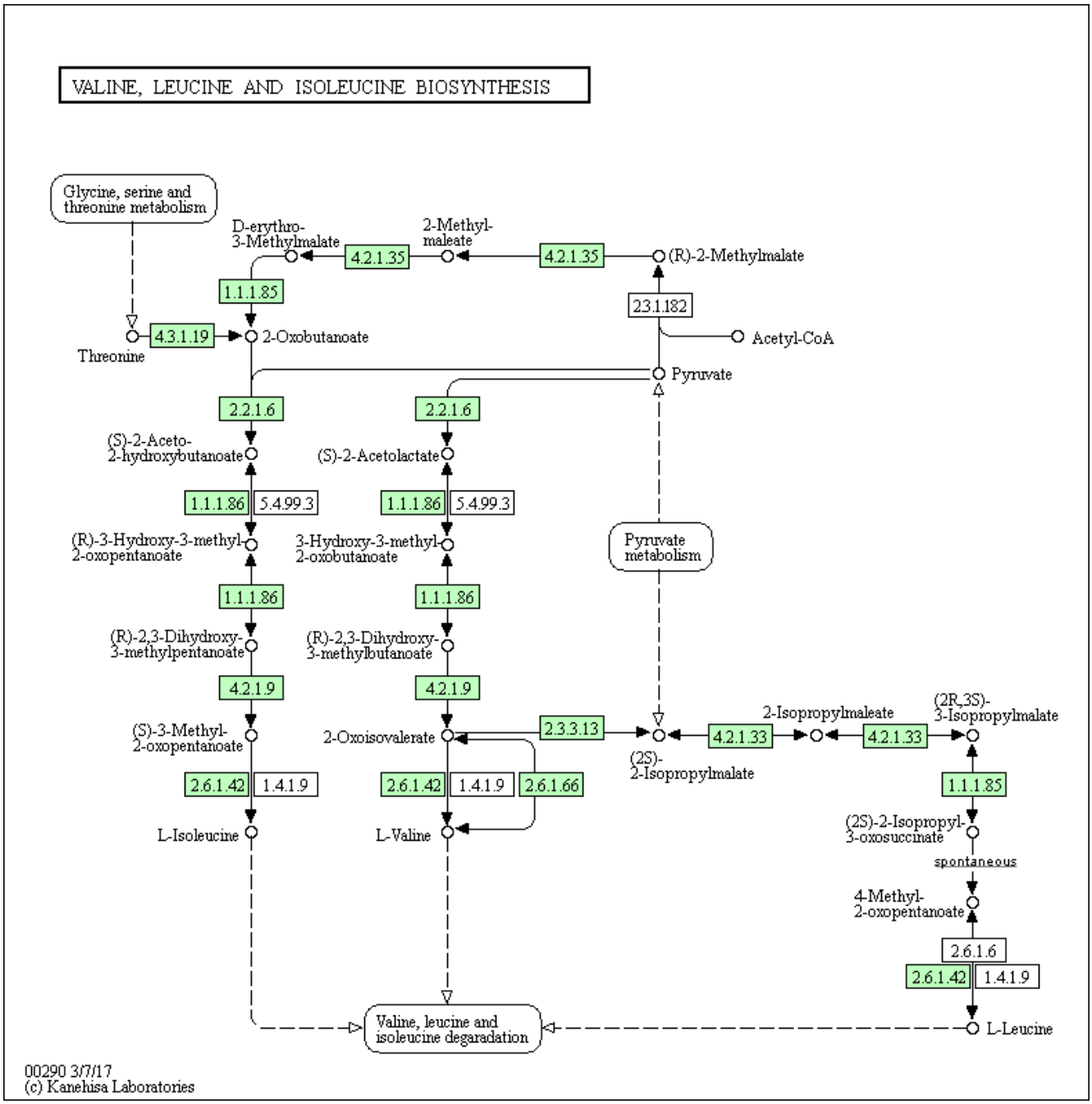

ARGININE BIOSYNTHESIS
L-Arginosuccinate
Glutamine
Alanine, aspartate and glutamate metabolism
Aspartate
Urea Cycle
Fumarate
Citrate cycle
Nitrogen metabolism
N-Acetyl-L-citrulline
Citrulline
Arginine
Arginine and proline metabolism
Pyrimidine metabolism
D-Arg & D-Orn metabolism
NH3
Carbamoyl-P
Ornithine
Urea
Urea-1-carboxylate
CO2
Excretion
2-Oxoglutarate
Glutamate
N-Acetyl-glutamate
N-Acetyl-glutamyl-P
N-Acetylglutamate semialdehyde
N-Acetyl-ornithine
ArgX
ArgB
ArgC
ArgD
ArgE
LysW-glutamate
LysW-glutamyl-P
LysW-L-glutamate semialdehyde
LysW-ornithine
00220 7/20/17
(c) Kanehisa Laboratories

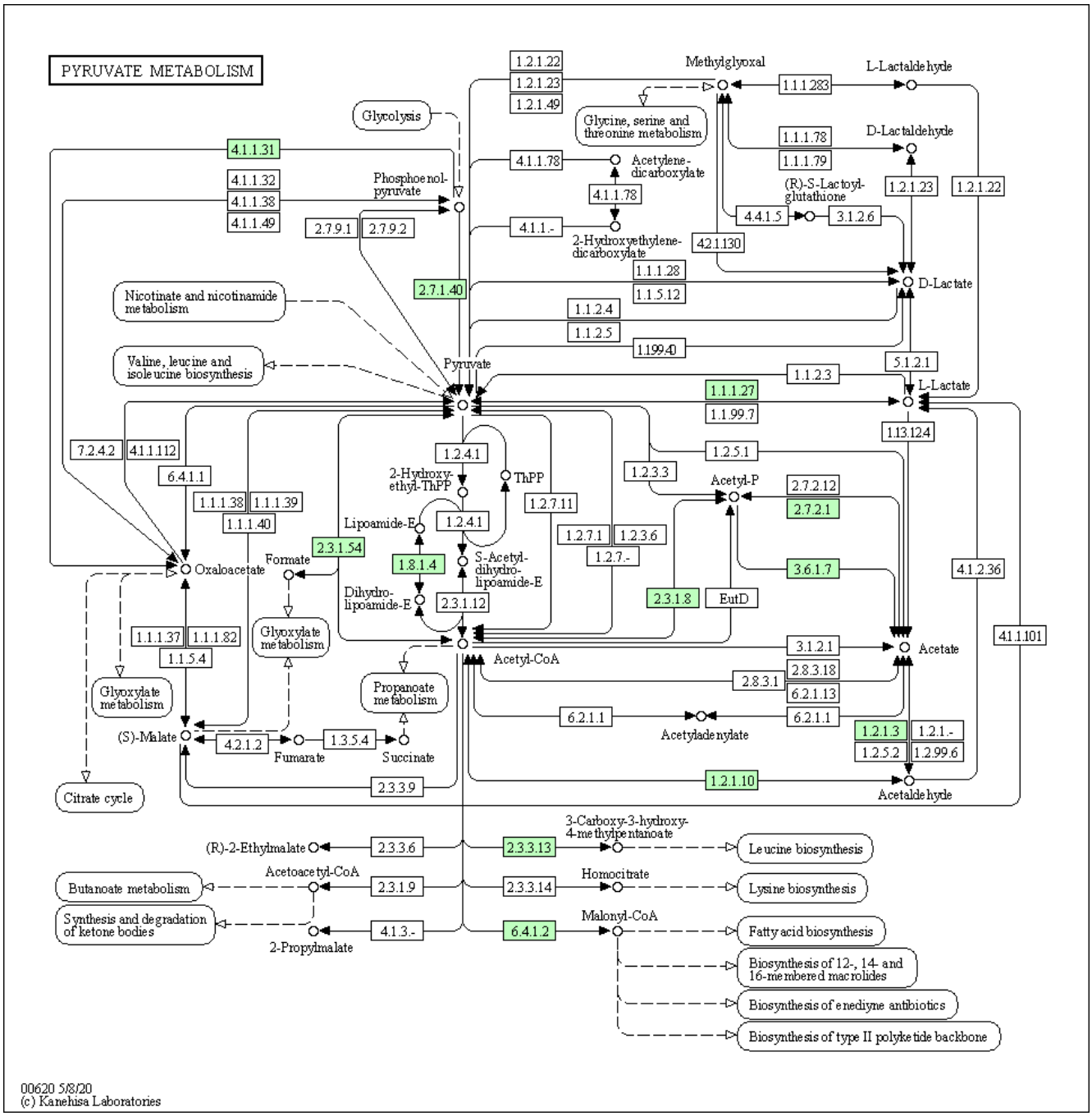

ALANINE, ASPARTATE AND GLUTAMATE METABOLISM
Cyanoamino acid metabolism
Arginine biosynthesis
Nicotine and nicotinamide metabolism
N-Carbamoyl-L-aspartate
Pyrimidine metabolism
Lysine biosynthesis
Monobactam biosynthesis
N-Acetyl-L-aspartate
N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamate
N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-glutamate
β-Alanine metabolism
D-Alanine metabolism
Gly, Ser & Thr metabolism
Pantothenate and CoA biosynthesis
L-Alanine
L-Aspartate
L-Asparagine
Adenylo-succinate
L-Arginino-succinate
Histidine metabolism
2-Oxosuccinamate
D-Aspartate
Fumarate
Oxaloacetate
Pyruvate
Citrate cycle
Citrate
β-Cityrl-L-glutamate
Glycolysis / Gluconeogenesis
Succinate
2-Oxo-glutarate
2-Oxoglutaramate
NH3
Aminosugars metabolism
D-Glucosamine-6P
Succinate semialdehyde
4-Aminobutanoate(GABA)
L-Glutamate
L-Glutamine
5-Phospho-ribosylamine
Purine metabolism
Histidine metabolism
Nitrogen metabolism
D-Gln & D-Glu metabolism
Glutathione metabolism
Porphyrine metabolism
Cyanoamino acid metabolism
Butanoate metabolism
C5-Branched dibasic acid metabolism
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism
Carbamoyl-phosphate
Pyrimidine metabolism
L-1-Pyrroline-5-carboxylate
Arginine biosynthesis
Arginine and proline metabolism
00250 8/3/13
(c) Kanehisa Laboratories

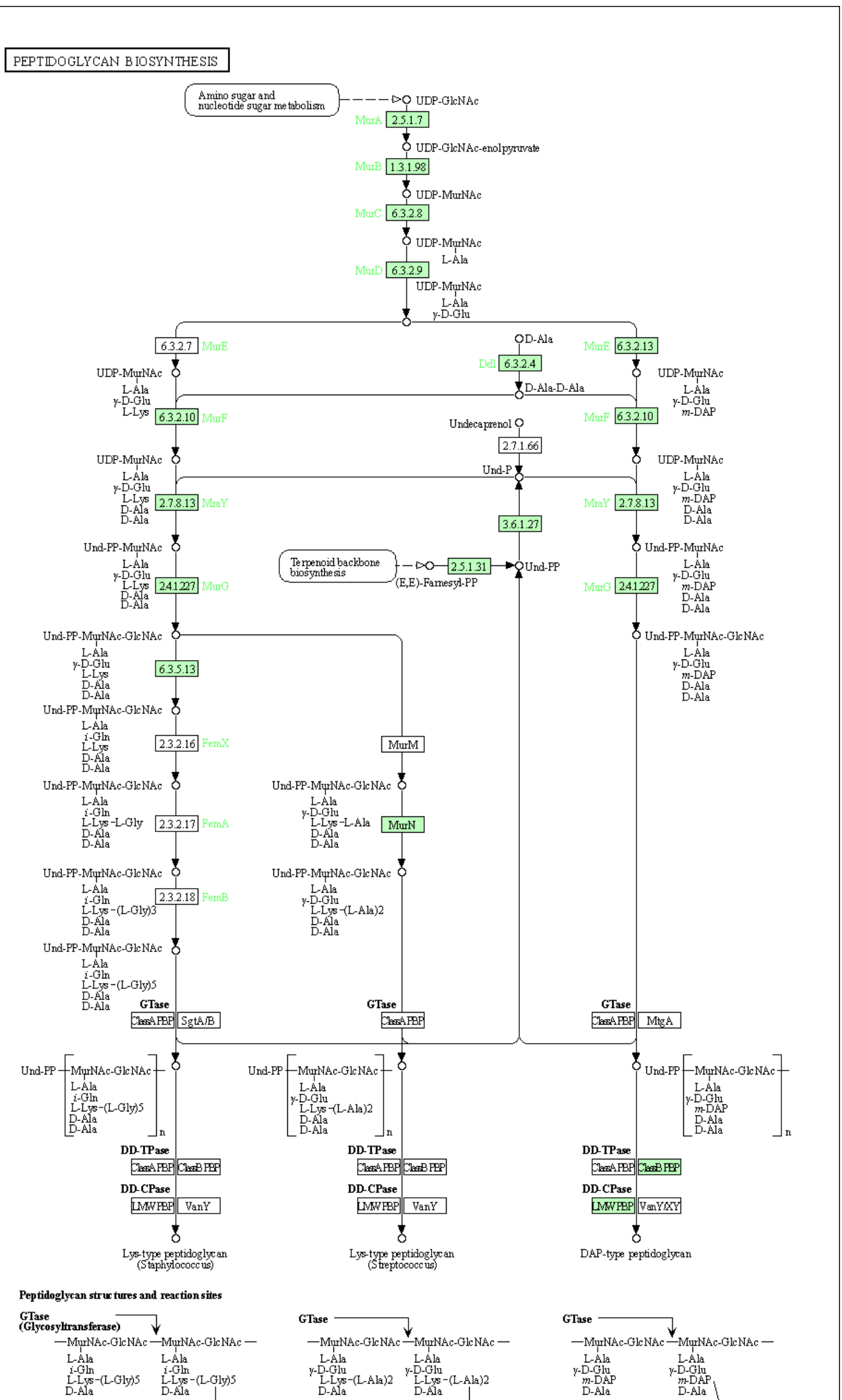

LYSINE BIOSYNTHESIS
L-Homoserine
Glycine, serine and threonine metabolism
1.1.1.3
L-Aspartate
2.7.2.4
L-4-Aspartyl phosphate
1.2.1.11
L-Aspartate 4-semialdehyde
4.3.3.7
(2S,4S)-4-Hydroxy-2,3,4,5-tetrahydro-dipicolinate
1.17.1.8
L-2,3,4,5-Tetrahydro-dipicolinate
Alanine, aspartate and glutamate metabolism
2.3.1.89
N-Acetyl-L-2-amino-6-oxopimelate
2.6.1.-
N-Acetyl-LL-2,6-diaminopimelate
2.3.1.117
N-Succinyl-L-2-amino-6-oxopimelate
2.6.1.17
N-Succinyl-LL-2,6-diaminopimelate
3.5.1.47
3.5.1.18
2.6.1.83
LL-2,6-Diaminopimelate
5.1.1.7
L-2-Amino-6-oxopimelate
1.4.1.16
meso-2,6-Diaminopimelate
6.3.2.13
UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-y-D-glutamyl-meso-2,6- diaminopimelate
6.3.2.10
UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimeloyl-D-alanyl-D-alanine
Peptidoglycan biosynthesis
Citrate cycle
2-Oxoglutarate
2.3.3.14
Homocitrate
4.2.1.-
4.2.1.114
Homo-cis-aconitate
Acetyl-CoA
Glycolysis
4.2.1.114
4.2.1.36
Homo-isocitrate
Pyruvate metabolism
1.1.1.87
1.1.1.286
2-Oxoadipate
2.6.1.39
2.6.1.57
5-Adenyl-2-aminoadipate
1.2.1.95
α-Aminoadipoyl-S-acyl enzyme
1.2.1.95
L-2-Aminoadipate 6-semialdehyde
L-Saccharopine
1.5.1.10
1.5.1.7
L-Lysine
4.1.1.20
Lysine degradation
Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis
PylB
LysK
3-Methyl-ornithine
1.2.1.95
LysX
LysZ
LysY
LysJ
L-2-Amino-adipate
LysW-y-L-α-aminoadipate
LysW-y-L-α-aminoadipyl-6-phosphate
LysW-y-L-α-aminoadipate 6-semialdehyde
LysW-y-L-lysine
PylC
PylD
3-Methylglutamuyl-5-semialdehyde-N6-lysine
Pyrrolysine
3-Methylornithinyl-N6-lysine
00300 2/3/20
(c) Kanehisa Laboratories

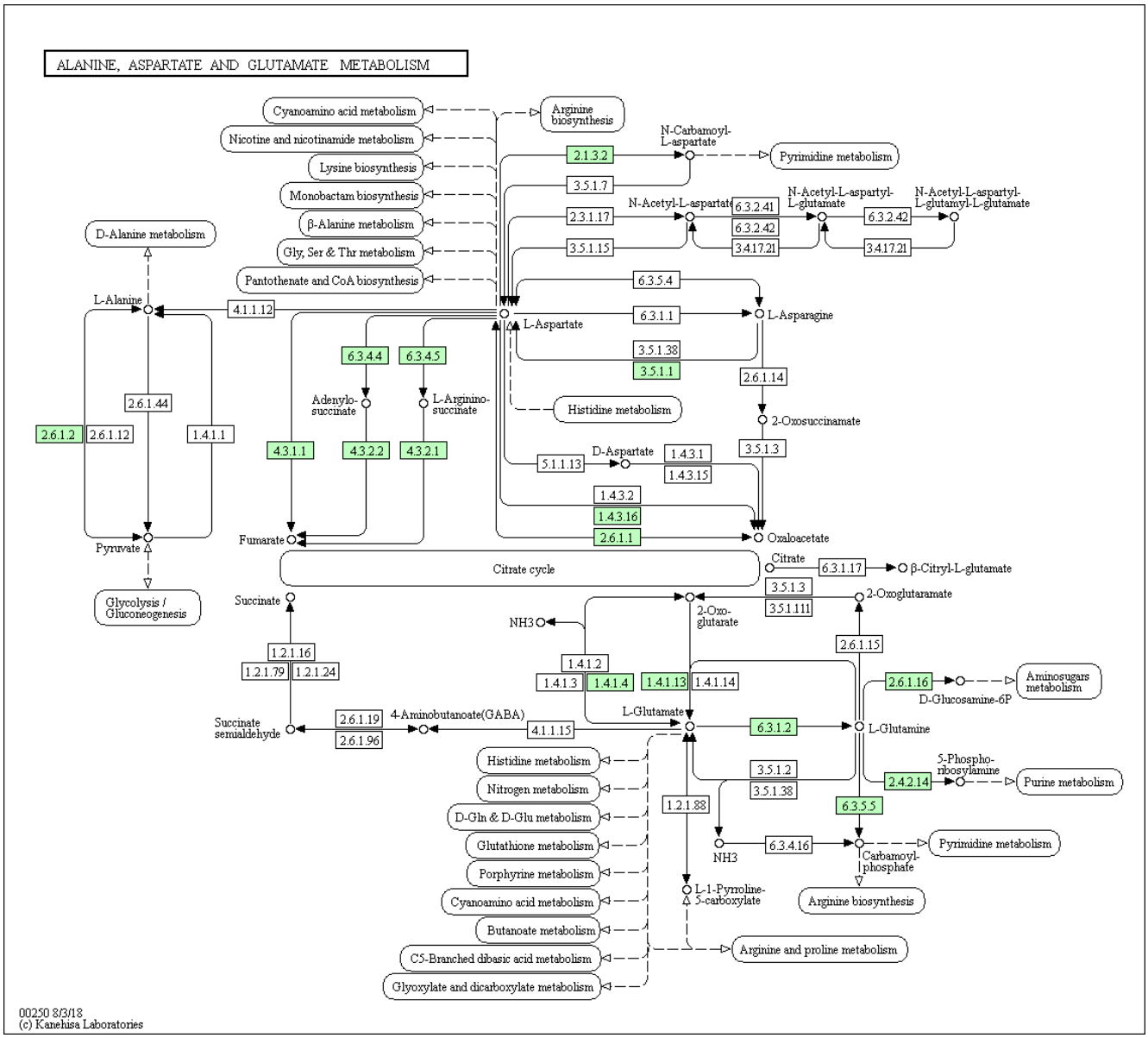

GLYCINE, SERINE AND THREONINE METABOLISM
Glyoxylate metabolism
2-Phospho-D-glycerate
5.4.2.11
5.4.2.12
Glycolysis / Gluconeogenesis
Hydroxy-pyruvate
1.1.1.29
1.1.1.81
2.7.1.165
Glycerate
3.1.3.38
2.7.1.31
3P-D-Glycerate
1.1.1.95
3P-Hydroxy-pyruvate
2.6.1.52
Phosphoserine
3.1.3.3
Methane metabolism
Sphingolipid metabolism
2.6.1.45
2.6.1.51
5.1.1.18
5.1.1.10
D-Serine
D-Lombricine
2.7.3.5
N-Phospho-D-lombricine
4.3.1.18
Citrate cycle
Pyruvate metabolism
4.3.1.17
4.3.1.19
Pyruvate
Serine
2.7.8.8
4.2.1.22
Cystathionine
4.2.1.22
4.2.1.20
L-Tryptophane
Tryptophane metabolism
Glycerophospholipid metabolism
O-Phosphatidyl-L-serine
4.4.1.1
2.6.1.45
Sulfur metabolism
Cyanoamino acid metabolism
2.1.2.1
Choline
Cysteine and methionine metabolism
L-Cysteine
5,10-Methylene-THF
1.14.15.7
1.1.3.17
1.1.99.1
GbsB
Arginine and proline metabolism
Creatine
2.1.1.2
2.1.4.1
Guanidinoacetate
3.5.3.3
1.4.2.1
1.4.3.3
Glyoxylate
Glyoxylate metabolism
NH3
Dihydro-lipoylprotein
2.6.1.4
2.6.1.44
CO2
THF
2.1.2.10
H-protein
GCSH
1.8.1.4
2.1.1.157
Betaine aldehyde
1.2.1.8
1.1.3.17
Dimethylglycine
2.1.1.5
1.5.3.10
1.5.8.4
Betaine
Sarcosine
1.5.3.1
1.5.8.3
2.1.1.20
Glycine
1.4.4.2
S-Amino-methyldihydro-lipoylprotein
2.1.1.161
2.1.1.156
2.3.1.37
5-Aminolevulinate
Porphyrine biosynthesis
Lipoylprotein
Purine metabolism
4.1.2.48
4.1.2.49
L-Allothreonine
1.1.1.381
Aminoacetone
2.3.1.29
1.1.1.75
Aminopropan-2-ol
4.1.2.48
4.1.2.5
L-2-Amino-acetoacetate
1.4.3.4
1.4.3.21
1.1.1.103
Methylglyoxal
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis
4.3.1.19
2-Oxobutanoate
Threonine
Propanoate metabolism
4.2.3.1
O-Phospho-L-homoserine
2.7.1.39
Propane-1,3-diamine
Arginine and proline metabolism
Cysteine and methionine metabolism
Homoserine
4.1.1.86
Ectoine biosynthesis
1.1.1.3
L-2,4-Diamino-butanoate
Alanine, aspartate and glutamate metabolism
L-Aspartate
2.7.2.4
L-4-Aspartyl-phosphate
1.2.1.11
2.6.1.76
L-Aspartate 4-semialdehyde
2.3.1.178
Nγ-Acetyl-L-2,4-diaminobutyrate
4.2.1.108
L-Ectoine
1.14.11.55
5-Hydroxyectoine
DoeC
DoeD
3.5.1.125
3.5.4.44
Nα-Acetyl-L-2,4-diaminobutyrate
Lysine biosynthesis
00260 4/11/19
(c) Kanehisa Laboratories


CYSTEINE AND METHIONINE METABOLISM
Glycine, serine and threonine metabolism
L-Serine
2-Aminoacrylate
4.3.1.17
2.3.1.30
O-Acetyl-L-serine
Sulfide
2.5.1.144
S-Sulfo-L-cysteine
1.8.4.3
Sulfate
Thiocysteine
4.4.1.13
4.4.1.1
4.4.1.35
S-Glutathionyl-L-cysteine
L-Cystine
1.8.1.10
Glutathione
1.8.4.4
1.8.1.6
2.7.1.226
2.5.1.47
2.5.1.65
2.8.5.1
O-Phospho-L-serine
3P-Hydroxy-pyruvate
2.6.1.52
1.1.1.95
Glycolysis
3P-D-Glycerate
Pantothenate and CoA biosynthesis
Glutathione metabolism
Taurine and hypotaurine metabolism
4.4.1.25
(2S)-3-Sulfolactate
1.1.1310
Bisulfite
3-Sulfo-pyruvate
1.1.1.37
1.1.1338
(2R)-3-Sulfolactate
4.4.1.24
Pyruvate
Pyruvate metabolism
4.4.1.10
L-Cysteine
L-Cysteate
2.6.1.1
2.6.1.1
2.6.1.3
4.4.1.13
4.4.1.1
4.4.1.28
5.1.1.10
1.13.11.20
4.4.1.15
D-Cysteine
Gly, Ser & Thr metabolism
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis
2.6.1.42
2.6.1.44
2-Oxobutanoate
6.3.2.2
6.3.2.3
L-2-Amino-butanoate
L-γ-Glutamyl-aminobutanoate
Ophthalmate
4.4.1.1
L-Cysteine-sulfinate
Propanoate metabolism
2.5.1.48
3-Mercapto-pyruvate
2.8.1.2
Pyruvate
3-Sulfino-pyruvate
2.6.1.1
1.4.1.-
4.1.1.12
Sulfur dioxide
L-Alanine
1.1.1.27
Sulfite
3-Mercaptolactate
Sulfur metabolism
Taurine and hypotaurine metabolism
2.5.1.48
O-Succinyl-L-homoserine
Aspartate metabolism
L-Aspartate-4-semialdehyde
2.3.1.46
2.7.2.4
1.2.1.11
1.1.1.3
L-Homoserine
L-Aspartate
L-4-Aspartyl-phosphate
2.3.1.31
L-Cystathionine
2.5.1.48
O-Acetyl-L-homoserine
4.2.1.22
4.4.1.13
2.5.1.134
2.8.1.16
2.5.1.48
2.5.1.49
2.5.1.48
2.5.1.-
Glycine, serine and threonine metabolism
L-Serine
L-Homocysteine
1.8.4.1
Homocystine
Sulfur metabolism
3.3.1.1
4.4.1.21
2.1.1.5
2.1.1.10
2.1.1.13
2.1.1.14
S-Adenosyl-L-homocysteine
3.2.2.9
S-D-Ribosyl-L-homocysteine
N-Acyl-L-homoserine lactone
L-Methionine S-oxide
1.8.4.13
1.8.4.14
2.1.1.37
2.1.1.-
2.3.1.184
S-Adenosyl-L-methionine
S-Methyl-5'-thioadenosine
S-Methyl-5'-thioinosine
L-Methionine
2.5.1.6
4.1.1.50
2.5.1.16
2.5.1.22
S-Adenosyl-methioninamine
3.5.4.31
N-Formyl-L-methionine
3.5.1.31
4.4.1.14
Aminoacyl-L-methyonine
3.4.13.12
1-Aminocyclopropane-1-carboxylate
3.5.99.7
2-Oxobutanoate
Propanoate metabolism
3.2.2.9
3.2.2.16
Sulfur metabolism
4.4.1.11
Methanethiol
1.14.17.4
S-Methyl-5-thio-D-ribose
2.4.2.28
2.4.2.44
2.6.1.5
2.6.1.57
2.6.1.117
3-Methylthio-propionate
Ethylene
2.7.1.100
1.4.3.2
2.6.1.-
Methionine salvage
S-Methyl-5-thio-D-ribose 1-phosphate
1.13.11.53
5.3.1.23
3.1.3.77
4-Methylthio-2-oxobutanoate
1.13.11.54
3.1.3.87
5.3.2.5
4.2.1.109
1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methyl-thiopentene
2-Hydroxy-3-keto-5-methylthiopentenyl-1-phosphate
2,3-Diketo-5-methyl-thiopentyl-1-phosphate
S-Methyl-5-thio-D-ribulose 1-phosphate
00270 1/21/20
(c) Kanehisa Laboratories


VALINE, LEUCINE AND ISOLEUCINE BIOSYNTHESIS
Glycine, serine and threonine metabolism
D-erythro-3-Methylmalate
2-Methyl-maleate
(R)-2-Methylmalate
4.2.1.35
4.2.1.35
1.1.1.85
2.3.1.182
Acetyl-CoA
Threonine
4.3.1.19
2-Oxobutanoate
Pyruvate
2.2.1.6
2.2.1.6
(S)-2-Aceto-2-hydroxybutanoate
(S)-2-Acetolactate
1.1.1.86
5.4.99.3
1.1.1.86
5.4.99.3
(R)-3-Hydroxy-3-methyl-2-oxopentanoate
3-Hydroxy-3-methyl-2-oxobutanoate
Pyruvate metabolism
1.1.1.86
1.1.1.86
(R)-2,3-Dihydroxy-3-methylpentanoate
(R)-2,3-Dihydroxy-3-methylbutanoate
4.2.1.9
4.2.1.9
(S)-3-Methyl-2-oxopentanoate
2-Oxoisovalerate
2.3.3.13
2-Isopropylmaleate
(2R,3S)-3-Isopropylmalate
4.2.1.33
4.2.1.33
(2S)-2-Isopropylmalate
2.6.1.42
1.4.1.9
2.6.1.42
1.4.1.9
2.6.1.66
1.1.1.85
L-Isoleucine
L-Valine
(2S)-2-Isopropyl-3-oxosuccinate
spontaneous
4-Methyl-2-oxopentanoate
2.6.1.6
2.6.1.42
1.4.1.9
Valine, leucine and isoleucine degaradation
L-Leucine
00290 3/7/17
(c) Kanehisa Laboratories


PYRUVATE METABOLISM
Glycolysis
Phosphoenol-pyruvate
Nicotinate and nicotinamide metabolism
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis
Pyruvate
Oxaloacetate
Formate
Lipoamide-E
2-Hydroxy-ethyl-ThPP
ThPP
S-Acetyl-dihydro-lipoamide-E
Dihydro-lipoamide-E
Acetyl-CoA
Acetyl-P
Acetate
Acetaldehyde
Acetyladenylate
Methylglyoxal
L-Lactaldehyde
D-Lactaldehyde
Glycine, serine and threonine metabolism
Acetylene-dicarboxylate
2-Hydroxyethylene-dicarboxylate
(R)-S-Lactoyl-glutathione
D-Lactate
L-Lactate
Glyoxylate metabolism
Propanoate metabolism
(S)-Malate
Fumarate
Succinate
Citrate cycle
(R)-2-Ethylmalate
3-Carboxy-3-hydroxy-4-methylpentanoate
Leucine biosynthesis
Butanoate metabolism
Acetoacetyl-CoA
Homocitrate
Lysine biosynthesis
Synthesis and degradation of ketone bodies
2-Propylmalate
Malonyl-CoA
Fatty acid biosynthesis
Biosynthesis of 12-, 14- and 16-membered macrolides
Biosynthesis of enediyne antibiotics
Biosynthesis of type II polyketide backbone
00620 5/8/20
(c) Kanehisa Laboratories


PEPTIDOGLYCAN BIOSYNTHESIS
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
UDP-GlcNAc
MurA 2.5.1.7
UDP-GlcNAc-enolpyruvate
MurB 1.3.1.98
UDP-MurNAc
MurC 6.3.2.8
UDP-MurNAc
L-Ala
MurD 6.3.2.9
UDP-MurNAc
L-Ala
γ-D-Glu
6.3.2.7 MurE
UDP-MurNAc
L-Ala
γ-D-Glu
L-Lys
6.3.2.10 MurF
UDP-MurNAc
L-Ala
γ-D-Glu
L-Lys
D-Ala
D-Ala
2.7.8.13 MraY
Und-PP-MurNAc
L-Ala
γ-D-Glu
L-Lys
D-Ala
D-Ala
2.4.1.227 MurG
Und-PP-MurNAc-GlcNAc
L-Ala
γ-D-Glu
L-Lys
D-Ala
D-Ala
6.3.5.13
Und-PP-MurNAc-GlcNAc
L-Ala
i-Gln
L-Lys
D-Ala
D-Ala
2.3.2.16 FemX
Und-PP-MurNAc-GlcNAc
L-Ala
i-Gln
L-Lys-L-Gly
D-Ala
D-Ala
2.3.2.17 FemA
Und-PP-MurNAc-GlcNAc
L-Ala
i-Gln
L-Lys-(L-Gly)3
D-Ala
D-Ala
2.3.2.18 FemB
Und-PP-MurNAc-GlcNAc
L-Ala
i-Gln
L-Lys-(L-Gly)5
D-Ala
D-Ala
GTase
ClassA PBP
SgtA/B
Und-PP
MurNAc-GlcNAc
L-Ala
i-Gln
L-Lys-(L-Gly)5
D-Ala
D-Ala
n
DD-TPase
ClassA PBP
ClassB PBP
DD-CPase
LMW PBP
VanY
Lys-type peptidoglycan (Staphylococcus)
D-Ala
Ddl 6.3.2.4
D-Ala-D-Ala
Undecaprenol
2.7.1.66
Und-P
3.6.1.27
Terpenoid backbone biosynthesis
2.5.1.31
Und-PP
(E,E)-Farnesyl-PP
MurM
Und-PP-MurNAc-GlcNAc
L-Ala
γ-D-Glu
L-Lys-L-Ala
D-Ala
D-Ala
MurN
Und-PP-MurNAc-GlcNAc
L-Ala
γ-D-Glu
L-Lys-(L-Ala)2
D-Ala
D-Ala
GTase
ClassA PBP
Und-PP
MurNAc-GlcNAc
L-Ala
γ-D-Glu
L-Lys-(L-Ala)2
D-Ala
D-Ala
n
DD-TPase
ClassA PBP
ClassB PBP
DD-CPase
LMW PBP
VanY
Lys-type peptidoglycan (Streptococcus)
MurE 6.3.2.13
UDP-MurNAc
L-Ala
γ-D-Glu
m-DAP
MurF 6.3.2.10
UDP-MurNAc
L-Ala
γ-D-Glu
m-DAP
D-Ala
D-Ala
MraY 2.7.8.13
Und-PP-MurNAc
L-Ala
γ-D-Glu
m-DAP
D-Ala
D-Ala
MurG 2.4.1.227
Und-PP-MurNAc-GlcNAc
L-Ala
γ-D-Glu
m-DAP
D-Ala
D-Ala
GTase
ClassA PBP
MtgA
Und-PP
MurNAc-GlcNAc
L-Ala
γ-D-Glu
m-DAP
D-Ala
D-Ala
n
DD-TPase
ClassA PBP
ClassB PBP
DD-CPase
LMW PBP
VanYXY
DAP-type peptidoglycan
Peptidoglycan structures and reaction sites
GTase (Glycosyltransferase)
MurNAc-GlcNAc
L-Ala
i-Gln
L-Lys-(L-Gly)5
D-Ala
MurNAc-GlcNAc
L-Ala
i-Gln
L-Lys-(L-Gly)5
D-Ala
GTase
MurNAc-GlcNAc
L-Ala
γ-D-Glu
L-Lys-(L-Ala)2
D-Ala
MurNAc-GlcNAc
L-Ala
γ-D-Glu
L-Lys-(L-Ala)2
D-Ala
GTase
MurNAc-GlcNAc
L-Ala
γ-D-Glu
m-DAP
D-Ala
MurNAc-GlcNAc
L-Ala
γ-D-Glu
m-DAP
D-Ala


ALANINE, ASPARTATE AND GLUTAMATE METABOLISM
Cyanoamino acid metabolism
Nicotine and nicotinamide metabolism
Lysine biosynthesis
Monobactam biosynthesis
β-Alanine metabolism
Gly, Ser & Thr metabolism
Pantothenate and CoA biosynthesis
Arginine biosynthesis
N-Carbamoyl-L-aspartate
Pyrimidine metabolism
2.1.3.2
3.5.1.7
N-Acetyl-L-aspartate
2.3.1.17
3.5.1.15
6.3.2.41
6.3.2.42
3.4.17.21
N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamate
6.3.2.42
3.4.17.21
N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-glutamate
D-Alanine metabolism
L-Alanine
4.1.1.12
6.3.5.4
L-Aspartate
6.3.1.1
L-Asparagine
3.5.1.38
3.5.1.1
2.6.1.14
6.3.4.4
6.3.4.5
Adenylo-succinate
L-Arginino-succinate
Histidine metabolism
2-Oxosuccinamate
2.6.1.44
2.6.1.2
2.6.1.12
1.4.1.1
4.3.1.1
4.3.2.2
4.3.2.1
5.1.1.13
D-Aspartate
1.4.3.1
1.4.3.15
3.5.1.3
1.4.3.2
1.4.3.16
2.6.1.1
Fumarate
Oxaloacetate
Pyruvate
Citrate cycle
Citrate
6.3.1.17
β-Citryl-L-glutamate
3.5.1.3
3.5.1.111
2-Oxoglutaramate
Glycolysis / Gluconeogenesis
Succinate
NH3
2-Oxo-glutarate
2.6.1.15
1.2.1.16
1.2.1.79
1.2.1.24
1.4.1.2
1.4.1.3
1.4.1.4
1.4.1.13
1.4.1.14
2.6.1.16
Aminosugars metabolism
D-Glucosamine-6P
Succinate semialdehyde
2.6.1.19
2.6.1.96
4-Aminobutanoate(GABA)
4.1.1.15
L-Glutamate
6.3.1.2
L-Glutamine
Histidine metabolism
Nitrogen metabolism
D-Gln & D-Glu metabolism
Glutathione metabolism
Porphyrine metabolism
Cyanoamino acid metabolism
Butanoate metabolism
C5-Branched dibasic acid metabolism
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism
3.5.1.2
3.5.1.38
5-Phospho-ribosylamine
2.4.2.14
Purine metabolism
1.2.1.88
6.3.5.5
NH3
6.3.4.16
Carbamoyl-phosphate
Pyrimidine metabolism
L-1-Pyrroline-5-carboxylate
Arginine biosynthesis
Arginine and proline metabolism
00250 8/3/18
(c) Kanehisa Laboratories