

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

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

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

« » червень 2021 р.

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

« » червень 2021 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: Одержання біомаси *Lactobacillus fermentum* для виробництва пробіотичного препарату «Фарманекс Про-Бі»

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 1

Максимець Олександра Олександрівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Грегірчак Наталія Миколаївна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2021 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

“ 01 ” квітня 20 21 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Максимець Олександри Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання біомаси *Lactobacillus fermentum* для виробництва пробіотичного препарату «Фарманекс Про-Бі»

керівник роботи Грегірчак Наталія Миколаївна, к.т.н., доцент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2021 року № 228-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 28.05.2021

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Lactobacillus fermentum*, цільовий продукт: біомаса молочнокислих бактерій, пробіотичний препарат «Фарманекс Про-Бі»

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

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва – 2 аркуша формату А1. Апаратурна схема виробництва – 2 аркуша формату А1. Схема ділянки автоматизації ліофільного сушіння біомаси *Lactobacillus fermentum* – 1 аркуш формату А3.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 9. Автоматизація ділянки виробництва	Клименко О.М., доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних систем управління		

7. Дата видачі завдання 01 квітня 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	02.04.2021-06.04.2021	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	07.04.2021-13.04.2021	
3	Техніко-економічне обґрунтування	14.04.2021-15.04.2021	
4	Біосинтез цільового продукту	16.04.2021-20.04.2021	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	21.04.2021-25.04.2021	
6	Специфікація обладнання	26.04.2021-27.04.2021	
7	Опис технологічної схеми	28.04.2021-05.05.2021	
8	Контроль виробництва	06.05.2021-10.05.2021	
9	Автоматизація ділянки виробництва	11.05.2021-16.05.2021	
10	Охорона довкілля	17.05.2021-20.05.2021	
11	Оформлення пояснювальної записки	10.04.2021-26.05.2021	
12	Виконання графічної частини проекту	26.04.2021-27.05.2021	

Здобувач

_____ (підпис)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Максимець О.О.
(прізвище та ініціали)

Грегірчак Н.М.
(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт присвячено розробці біосинтезу біомаси *Lactobacillus fermentum* для одержання пробіотичного препарату «Фарманекс-Про-Бі».

Технологічний процес складається з допоміжних робіт (підготовка вентиляційного та аераційного повітря, санітарна підготовка виробництва (мийних та дезінфікуючих засобів), підготовка виробничих приміщень, обладнання, персоналу, підготовка і стерилізація допоміжних розчинів, поживних середовищ та захисного середовища), технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез біомаси *Lactobacillus fermentum* F6, зберігання культуральної рідини, центрифугування, змішування з захисним середовищем, ліофілізація, подрібнення та просіювання), етап пакування маркування та відвантаження готового продукту та стадії знешкодження рідких, твердих та газоподібних відходів. Було проведено техніко-економічний розрахунок потреби у біомасі *Lactobacillus fermentum*. Особливістю процесу є створення мікроаерофільних умов для підвищення утворення біомаси.

Дипломний проєкт складається з вступу, десяти розділів, тринадцяти таблиць, дванадцяти рисунків та графічної частини (двох технологічних схем – формату А1, двох апаратурних схем – формату А1, схема автоматизації виробництва- формат А3), списку використаних джерел (154) та додатків. Загальний обсяг роботи – 142 сторінки.

Ключові слова: біомаса, *Lactobacillus fermentum*, молочнокислі бактерії, пробіотик, БАД, біосинтез, захисне середовище, центрифугування, ліофілізація.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	1
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	8
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	11
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	13
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	19
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	21
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	22
3.1. Потреба у біомасі <i>Lactobacillus fermentum</i>	22
3.1.1. Розрахунок річної потреби у цільовому продукті.....	26
3.2. Розрахунок потужності виробництва	27
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості стадій підготовки посівного матеріалу	28
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу біомаси <i>Lactobacillus fermentum</i>	30
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	35
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	35
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	35
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	37
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	37
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	37

5.1.2. Обґрунтування вибору стадій підготовки аераційного повітря.....	42
5.1.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища ...	45
5.1.4 Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН.....	45
5.2. Обґрунтування стадій виділення цільового продукту	45
5.2.1. Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання.....	46
5.2.2. Додавання захисного середовища	49
5.2.3. Сушіння	50
5.2.4. Подрібнення.....	53
5.2.5. Просіювання	55
5.2.6. Маркування пакування та відвантаження	56
5.3. Обґрунтування фармацевтичної складової проекту	59
5.3.1. Обґрунтування вибору «чистих» приміщень.....	59
5.3.2. Обґрунтування підготовки вентиляційного повітря.....	61
5.3.3. Обґрунтування водопідготовки	63
5.3.4. Обґрунтування миючих та дезінфікуючих засобів.....	64
5.4. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях	67
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	75
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	78
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	97
8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів	97
8.2. Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ	104
8.3. Показники росту.....	104
8.3.1 Концентрація біомаси.....	104

8.3.2. Визначення концентрацій джерел вуглецю та азоту.....	105
8.4. Показники якості готового продукту.....	107
8.4.1. Зовнішній вигляд пробіотика Фарманкс Про-Бі	107
8.4.2. Автентичність препарату пробіотика Фарманкс Про-Бі	107
8.4.3. Розпадання	107
8.4.4. Розчинення.....	109
8.4.5. Однорідність вмісту.....	109
8.4.6. Супровідні домішки.....	109
8.4.7. Втрата в масі при висушуванні	110
8.4.8. Специфічна нешкідливість	110
8.4.9. Мікробіологічна чистота	110
8.4.10. Специфічна активність	112
РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА.....	116
9.1. Опис функціональної схеми автоматизації з специфікацією засобів автоматизації	118
РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	122
10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів	122
10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	123
10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів	123
10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	126
10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів	127
10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів.....	127
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	130
ДОДАТКИ.....	145

ВСТУП

Актуальність проєкту.

Важливою проблемою сучасної медицини є неухильне зростання чисельності хворих, що страждають на «хвороби цивілізації» (серцевосудинні та онкологічні захворювання, гепатити, ожиріння, цукровий діабет, жовчо- та сечокам'яні хвороби, алергічні прояви, ураження суглобів і сполучної тканини тощо). Це спонукало до перегляду основних концепцій в галузі медичної мікробіології і переходу від методів тотального знищення мікрофлори до спроб відновлення природних, гармонійних взаємовідносин організму людини з природними мікробними популяціями, що є основою його мікроекологічної системи (мікробіому). Пробиотики використовуються в лікувальних цілях при багатьох захворюваннях, а також для профілактики хвороб шлунково-кишкового тракту і підтримки загального здоров'я [1].

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) визначила пробиотики як "живі мікроорганізми, які при введенні у достатній кількості надають користь для здоров'я господаря" [2].

Загальна користь пробиотиків полягає у створенні більш сприятливого середовища для кишкової мікробіоти з допомогою загальних механізмів для більшості пробиотиків. Дві головні загальні переваги, пов'язані з дією пробиотичних препаратів – це підтримка здорового травного тракту і здорової імунної системи (запобігання алергічних захворювань, посилена протиінфекційна активність, а також підтримка здоров'я репродуктивного тракту, ротової порожнини, легень, шкіри та кишечника) [3].

Ринок пробиотиків є одним з найбільш активно зростаючих. Щорічний обсяг продажів пробиотиків в світі у 2016 р. досяг 42 млрд. доларів США, що підтверджує їх високу затребуваність [4].

					НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ	Лім.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Макимець О.О.					8	142
Перевір.		Грегірчак Н.М.						8
Консультант								
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		

Лактобактерії становлять меншу частину мікрофлори кишечника, проте виконують не менш важливі метаболічні функції, ніж основний представник нормальної мікрофлори товстого кишечника - біфідобактерії. Лактобактерії пригнічують в кишечнику зростання гнільних і умовно-патогенних мікроорганізмів за рахунок здатності утворювати такі речовини, як молочна кислота, лізоцим, бактеріюцини. Ці продукти життєдіяльності лактобактерій володіють вираженим антибактеріальним ефектом, а також впливають на мембрани епітеліоцитів, ДНК-синтез і синтез протеїну в слизовій оболонці кишечника. Штам пригнічує розмноження патогенної мікрофлори та умовно патогенної мікрофлори - *Salmonella typhosa*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* [5,6].

Одним з представником таких бактерій є *Lactobacillus fermentum*, що має низку переваг для використання у складах пробіотиків та продуктах харчування. Штами *L. fermentum* насамперед мають високий рівень метаболізму холестерину, стимулюють імунну систему кишечника виробляти клітини, багаті антитілами та цитокінами, які разом сигналізують про процеси, що блокують системне запалення. *L. fermentum* виробляє в кишечнику антимікробні та антиоксидантні хімічні речовини, що зменшують розвиток деяких патогенних бактерій, в тому числі грамнегативних патогенів та грам-позитивних організмів, такі як ентерококи і золотистий стафілокок [7].

Новизна проєкту.

Культивування високопродукуючого штаму *Lactobacillus fermentum* F6 глибинним методом при мікроаерофільних умовах для високого виходу біомаси з подальшим її ліофільним висушуванням та пакуванням у капсули.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

На даний час існує великий інтерес до терапевтичних стратегій прямого або непрямого впливу на мікробіоту кишечника. Це - використання пробіотиків, пребіотиків та інших харчових добавок, трансплантація фекалій. Найбільш вживаним є застосування пробіотиків [8,9,10].

Цільовим продуктом даного проекту буде виступати біомаса молочнокислих бактерій *Lactobacillus fermentum*, яка є основним компонентом в складі пробіотичного препарату Фарманекс Про-Бі.

При створенні пробіотичних препаратів особливу увагу звертають на антагоністичну активність і виражені адгезивні властивості, які дозволяють успішно колонізувати кишечник корисними мікроорганізмами.

Lactobacillus fermentum здатні знижувати проникність слизової оболонки ШКТ, яку викликають нестероїдні протизапальні препарати, проявляють антагоністичну активність по відношенню до ентерококів, *Staphylococcus aureus* [11].

Фарманекс Про-Бі (Pharmanex Pro-B)-біологічно активна добавка, виробника DESERT LABORATORIES (США) [12].

Лікарська форма: капсули.

Форма випуску, упаковка і склад продукту Фарманекс Про-Бі: Капсули прозорі; вміст капсул-порошок майже білого кольору; масою 344 мг. В 1 капсулі біомаси *Lactobacillus fermentum* – 30-90 мг ($\geq 2 \times 10^9$ КУО) [12].

Допоміжні речовини: целюлоза мікрокристалічна - 174-234 мг, стеаринова кислота - 6 мг, кремнію діоксид - 4 мг.

Склад оболонки капсули: гідроксипропілметилцелюлоза, вода, карагінан, калію хлорид.

					НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Максимець О.О.			РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					8	142
Консультант						Кафедра БТМ 10		
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Групова приналежність: БАД - джерело пробіотичних лактобактерій.

Властивості:

Препарат біологічного походження, який регулює рівновагу кишкової мікрофлори, пробіотик.

Містить живу культуру резистентних до кислого середовища шлунка бактерій *Lactobacillus fermentum*. Лактобактерії мають високу адгезію до слизистих оболонок, що сприяє утворенню поверхневого захисного біошару на стінках кишечника. Мають антагоністичну активність відносно патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів за рахунок продукції в процесі метаболізму органічних кислот (в основному, молочної) і бактеріоцинів [12].

Протизапальну дію препарату зумовлена пригніченням синтезу прозапальних цитокінів ФНП, γ -інтерферону, ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-12 та стимуляцією синтезу інтерлейкіну-10. Екзополісахариди *Lactobacillus fermentum* зменшують вираженість оксидативного стресу шляхом збільшення активності супероксиддисмутази і каталази і зменшення вмісту малондіальдегіду і активності мієлопероксидази [12].

Імуностимулюючу і імуномодулюючу дію *Lactobacillus fermentum* пов'язано з присутністю в їх клітинній стінці пептидогліканів і тейхоєвих кислот, утворенням аргініну та оксиду азоту, а також запобіганням адгезії до стінок кишечника патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів і утворення ними ендотоксинів [12].

Проводилися дослідження, що показують позитивний вплив *Lactobacillus* на підвищення чутливості до інсуліну, обмін вітаміну D, зниження рівня холестерину і ЛПНЩ [12].

Область застосування продукту Фарманекс Про-Бі:

В якості біологічно активної добавки до їжі - додаткового джерела пробіотичних лактобактерій:

- для профілактики і лікування дисбактеріозу, в т.ч. асоційованого з прийомом антибіотиків;
- в складі комплексної терапії:

- запальних захворювань шлунково-кишкового тракту (ентеритів, колітів);
- алергічних реакцій;
- синдрому роздратованого кишечника [12].

Побічні ефекти: Не знайдено.

Протипоказання: індивідуальна непереносимість компонентів препарату.

- **Особливі вказівки:** Біологічно активна добавка до їжі; не є лікарським засобом. Перед застосуванням рекомендується проконсультуватися з лікарем [13].

Рекомендації по застосуванню. Дорослим приймати по 1 капсулі 1 раз під час їжі, запиваючи склянкою води. Тривалість прийому-1 місяць [14].

Умови зберігання продукту Фарманекс Про-Бі:

Продукт слід зберігати при температурі не вище 20 °С, далеко від джерел тепла, сонячного світла і підвищеної вологості.

- **Термін придатності продукту Фарманекс Про-Бі:** Термін придатності - 18 місяців [14].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Пробіотики – препарати (продукти), що містять в деякій кількості певні види живих мікроорганізмів, які викликають зміни мікрофлори (за допомогою імплантації або колонізації) організму і тим самим роблять благотворний вплив, включаючи скорочення тривалості інфекційних захворювань або зменшення чутливості до патогенів [15].

Пробіотичні препарати, що містять *Lactobacillus fermentum* зазвичай багатокомпонентні, тобто у своєму складі містять декілька штамів бактерій одного й того самого виду та роду або представників різних видів і родів. Наразі фармацевтичний ринок України представлений такими пробіотиками, які в своєму складі містять *Lactobacillus fermentum* (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Пробіотичні препарати, що містять *Lactobacillus fermentum*

Назва пробіотика	Культури	Концентрація клітин, КУО/мл	Виробник, Країна	Література
Лактовіт форте	Біфідобактерії, лактобацили (<i>Lactobacillus fermentum</i> ВКІМ У-5798), лактококи, стрептококи, пропіоновокислі, оцтовокислі бактерії	$1,1 \times 10^9$	Merco Pharmaceuticals Private Limited, Індія	16
Апібакт	Біфідобактерії, лактобацили (<i>L. fermentum</i> ВКІМ В-5798), пропіоновокислі бактерії	$(3,0 - 3,5) \times 10^{12}$	О.Д. Пролісок, Україна	17,18

					НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Максимець О.О.						11	142
Перевір.	Грегірчак Н.М.					13		
Консультант						Кафедра БТМ		
Н.Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

Пробізіс Феміна	Біфідобактерії лактобацили (<i>Lactobacillus fermentum</i>)	10×10^9	Unique biotech limited, Індія	19
Симбітер- форте	Біфідобактерії лактобацили (<i>Lactobacillus fermentum</i> 1МВ В- 7133), пропіоновокислі бактерії	$1,2 \times 10^{10}$	О.Д. Пролісок, Україна	20

Проаналізувавши вищезазначені дані, можна зробити висновок, що на фармацевтичному ринку України є препарати, що мають в своєму складі *L. fermentum*. Насамперед це українська фірма «О.Д. Пролісок» та індійські виробники: Mepro Pharmaceuticals Private Limited та Unique Biotech Limited. «Симбітер-форте», як один з представників II покоління пробіотиків – засобів на основі бактерій, які в нормі не проживають в кишечнику, можуть пригнічувати розвиток патогенних мікроорганізмів. До самоелімінірувальних анатагоністів відносять також «Біоспорин», «Ентерол», «Споробактерин», «Симбітер».

Оскільки, склад наведених препаратів не відносять до типової мікрофлори людини, біомасу *Lactobacillus fermentum* можна використовувати не тільки для виробництва лікарських засобів, а й у різних галузях харчової промисловості. Наприклад, додавати у склад заквасок, БАДів, молоко- та м'ясопереробної, хлібопекарської, виноробної галузях.

До складу заквасок, що використовуються в хлібопекарській промисловості, входять *L. fermentum*, *L. plantarum* та ін. Найбільш активно бактерії роду *Lactobacillus* використовуються для виробництва кисломолочних продуктів, щоб підвищити їх пробіотичні властивості. Розвиток бактерій закваски в молоці призводить до його збагачення цінними метаболітами: лактатом, біотином, ніацином, тіаміном, фолієвою кислотою, бактеріоцином [21].

Для переробки рослинної сировини, зокрема, квашення капусти, заготовлення солоних огірків, помідорів і т. п., також використовуються лактобацили, щоб надати їжі більше корисних властивостей [22].

Лактобацили мають стерилізуючу і консервуючу дію тому що вони продукують органічні кислоти (перш за все молочну, а також оцтову), етанол, ароматичні сполуки, перекис водню, бактеріоцини, екзополісахариди і деякі ферменти [23].

Отже, отримання біомаси *Lactobacillus fermentum* є доцільним і буде мати попит на ринку України, як для одержання фармацевтичних препаратів, так і в галузях харчової промисловості.

Узагальнена характеристика технологічних особливостей одержання штамів *Lactobacillus fermentum* як компонента пробіотика наведено у табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Особливості одержання біомаси для пробіотика «Фарманекс Про-Бі» за допомогою різних штамів *Lactobacillus fermentum*

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація життєдіяльних клітин КУО/см ³ .	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
<i>Lactobacillus fermentum</i> СЕСТ5716	Панкреатичний гідролізат з казеїну - 10,0; м'ясний екстракт - 8,0; дріжджовий екстракт - 4,0; глюкоза - 20,0; фосфат калію двозаміщений - 2,0; твін-80 - 1,0; амоній лимоннокислий двозаміщений - 2,0; ацетат натрію - 5,0; MgSO ₄ · 7H ₂ O - 0,2; MnSO ₄ · 5H ₂ O - 0,04.	24 год	1×10 ⁸	Культивування проводили в анаеробних умовах під 10% Н ₂ ; 10% СО ₂ ; 80% N ₂ . 37 °С	Pe´rez-Cano F. J., Honglin D., Yaqoob P. In vitro immunomodulatory activity of <i>Lactobacillus fermentum</i> СЕСТ5716 and <i>Lactobacillus salivarius</i> СЕСТ5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. <i>Immunobiology</i> . 2010, 215(1): 996–1004. doi:/10.1016/j.micpath.2020.104063

Продовження табл.2.2

<p><i>Lactobacillus fermentum</i> 3872</p>	<p>Панкреатичний гідролізат з казеїну - 10,0; м'ясний екстракт - 8,0; дріжджовий екстракт - 4,0; глюкоза - 20,0; фосфат калію двозаміщений - 2,0; твін-80 - 1,0; амоній лимоннокислий двозаміщений - 2,0; ацетат натрію - 5,0; MgSO₄ · 7H₂O - 0,2; MnSO₄ · 5H₂O-0,04.</p>	<p>18 год</p>	<p>6,0×10⁸</p>	<p>Культивування проводили при 37°C рН 6,5</p>	<p>Патент Росії на винахід №2528862. Штамм <i>Lactobacillus fermentum</i>, що володіє широким спектром антагоністическої активності і пробіотический консорціум лактобактерій для виготовлення бактеріальних препаратів /Абрамов В.М., Хлебников В.С., Пчелинцев С.Ю. Опубл. 20.09.2014, Бюл. № 26.</p>
<p><i>Lactobacillus fermentum</i> F6</p>	<p>Сахароза - 62,0; дріжджовий екстракт - 35,5; панкреатичний гідролізат з казеїну - 12,0. лимонна кислота - 1,35; цитрат натрію - 22; MgSO₄ · 7H₂O - 2; MnSO₄ · 5H₂O - 0,1. Твін-80 - 1,0.</p>	<p>24 год</p>	<p>2,3×10¹⁰</p>	<p>Культивування проводили при 37°C при рН 6,5</p>	<p>Xingchang Zh., Xia Ch., Qi Zh. Study on the Optimization of Enrichment Medium of <i>Lactobacillus fermentum</i> F6 and its High-density Cultivation. <i>J. of Dairy Sci. and Techn.</i> 2010, 3(142): 101-107. doi:10.15922/j.cnki.jdst.2010.03.009</p>

За результатами наведеними у *табл. 2.2*, показано, що найбільший синтез біомаси спостерігається у *L. fermentum* F6 - це $2,3 \times 10^{10}$ КУО/мл, найнижчий у *L. fermentum* СЕСТ5716- 1×10^8 КУО/мл.

Проте, така порівняльна характеристика технологічного процесу є недостатньою, щоб оцінювати найкращого біологічного агента. Тому на наступному етапі вибору порівнюємо вартість поживних середовищ (*табл. 2.3*) використовуваних усіма продуцентами.

Таблиця 2.3

Вартість компонентів поживного середовища для культивування штамів *Lactobacillus fermentum*

Продуцент	Компонент поживного середовища	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1,2,3)*
<i>L. fermentum</i> 3872	Панкреатичний гідролізат з казеїну 10,0	9447,16	94,47	1
	М'ясний екстракт 8,0	7296	58,3	2
	Дріжджовий екстракт 4,0	1502,72	6,01	3
	Глюкоза 20,0	34	0,68	4
	Фосфат калію двозаміщений 2,0	99,60	0,19	5
	Твін-80 1,0	210	0,21	4
	Амоній лимоннокислий двозаміщений 2,0;	525	1,05	6
	Ацетат натрію 5,0	65	0,325	4
	MgSO ₄ · 7H ₂ O 0,2	50	0,01	4
	MnSO ₄ · 5H ₂ O 0,04	1	0,00004	7
Вартість 1л середовища- 161,25 грн				
<i>L. fermentum</i> СЕСТ5716	Панкреатичний гідролізат з казеїну 10,0	9447,16	94,47	1
	М'ясний екстракт 8,0	7296	58,3	2
	Дріжджовий екстракт 4,0	1502,72	6,01	3
	Глюкоза 20,0	34	0,68	4
	Фосфат калію двозаміщений 2,0	99,60	0,19	5

	Твін-80 1,0	210	0,21	4
	Амоній лимоннокислий двозаміщений 2,0;	525	1,05	6
	Ацетат натрію 5,0	65	0,325	4
	MgSO ₄ · 7H ₂ O 0,2	50	0,01	4
	MnSO ₄ · 5H ₂ O 0,04	1	0,00004	7
	Вартість 1л середовища- 161,25 грн			
<i>L.fermentum</i> F6	Сахароза 62	90	5,58	4
	Дріжджовий екстракт 35,5	1502,72	53,34	3
	Панкреатичний гідролізат казеїну 12	9447,16	113,4	1
	Лимонна кислота 1,35	25	0,034	4
	Цитрат натрію 22	40	0,88	4
	MgSO ₄ · 7H ₂ O 2	50	0,1	4
	MnSO ₄ · 5H ₂ O 0,1	1	0,0001	7
	Твін 80 1	210	0,21	4
	Вартість 1л середовища- 173,54 грн			

Примітка. * – Ціни наведено станом на січень 2020 р. 1. <https://shop.hlr.ua/> 2. <http://lab-mir.com>, 3. <https://www.laboratorii.com>, 4. <https://prom.ua>, 5. <https://www.systopt.com.ua>, 6. <https://mendeleevmarket.com>, 7. <https://www.covalent.com.ua>.

Відмічено, що середовище для культивування *L. fermentum* 3872, *L. fermentum* СЕСТ5716 (161,25 грн) є дешевшими на 12 грн, ніж для культивування *L. fermentum* F6 (173,54 грн).

Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент треба розрахувати умовну вартість 1 мг цільового продукту – біомаси (табл. 2.4).

Для коректного розрахунку вартості 1 г цільового продукту потрібно перейти від КУО/мл до г/л. Це можна зробити шляхом розрахунку теоретично можливої біомаси виходячи з кількості азоту в середовищі культивування.

Для розрахунку спочатку оберемо *L.fermentum* 3872 та його середовище культивування. Джерелом азоту в середовищі виступають панкреатичний гідролізат казеїну, цитрат амонію та дріжджовий екстракт. В даному випадку розрахунок рівня біомаси за дріжджовим автолізатом не доречний, так як останній в наведених концентраціях виступатиме лише фактором росту.

Спочатку ведемо розрахунок за панкреатичним гідролізатом казеїну (білок молока). Формула цієї сполуки $C_{81}H_{125}N_{22}O_{39}P$. Молекулярна маса становить 2060 г/л. Отже у 2060 г казеїну міститься 308 г азоту, а в 10 г цієї сполуки вміст азоту дорівнює $(10 \times 308) / 2060 = 1,49$ г. Якщо у біомасі міститься 10% азоту, то з 1,49 г азоту можна одержати 14,95 г/л біомаси ($1,49 / 0,1 = 14,95$ г). Таку ж саму біомасу має штам *Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716 це пояснюється тим, що джерелом азоту також є панкреатичний гідролізат казеїну в тій самій кількості. Тому біомаса цього продуцента дорівнює 14,95 г/л. Згідно методичних вказівок, рівень біомаси для молочнокислих мікроорганізмів має складати 6-8 г/л. Отже обираємо 6 г/л.

Розраховуємо 1 г цільового продукту для *L.fermentum* F6. Джерело азоту - панкреатичний гідролізат казеїну (білок молока). Формула цієї сполуки $C_{81}H_{125}N_{22}O_{39}P$. Молекулярна маса становить 2060 г/л. Отже у 2060 г казеїну міститься 308 г азоту, а в 12 г цієї сполуки вміст азоту дорівнює $(12 \times 308) / 2060 = 1,79$ г. Якщо у біомасі міститься 10% азоту, то з 1,79 г азоту можна одержати 17,9 г/л біомаси ($1,79 / 0,1 = 17,9$ г). Згідно методичних вказівок, рівень біомаси для молочнокислих мікроорганізмів має складати 6-8 г/л. Отже обираємо 7 г/л.

Крім панкреатичного гідролізату казеїну, як джерело азоту, штамми *L.fermentum* 3872 та *L. fermentum* СЕСТ5716 мають амоній лимоннокислий двозаміщений. Формула цитрату амонію $C_6H_{17}N_3O_7$. Молекулярна маса становить 243 г/л. Отже у 243 г цитрату амонію міститься 42 г азоту, а в 2 г цієї сполуки вміст азоту дорівнює $(2 \times 42) / 243 = 0,35$ г. Якщо у біомасі міститься 10% азоту, то з 0,35 г азоту можна одержати 3,5 г/л біомаси ($0,35 / 0,1 = 3,5$ г).

Так як цитрат амонію є в складі поживних середовищ тільки у двох штамів, то порівнювати мікроорганізми будемо за панкреатичним гідролізатом казеїну, що є у складі середовищ всіх штамів.

Умовна вартість 1 г цільового продукту (пробіотика) при культивуванні штамів *Lactobacillus fermentum*

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація біомаси г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість біомаси утвореної за годину г/год
<i>L. fermentum</i> 3872	161,25	6	26,9	18	0,33
<i>L. fermentum</i> СЕСТ5716	161,25	6	26,9	24	0,25
<i>L. fermentum</i> F6	173,54	7	24,8	24	0,29

Проаналізувавши отримані результати, можна відмітити, що умовна вартість 1 г цільового продукту є найменшою у *L. fermentum* F6 – 24,8 грн/г. Найдорожчими для отримання 1 г цільового продукту є *Lactobacillus fermentum* 3872 та *L. fermentum* СЕСТ5716 (26,9 грн/г). Найбільший показник утворення біомаси у *L. fermentum* 3872 він становить 0,33 г/год, несуттєво менше (на 0,04 г/год) у *L. fermentum* F6 – 0,29 г/год.

Отже, можна зробити висновок, що найкращим штамом для одержання біомаси бактерій є *Lactobacillus fermentum* F6. Хоча цей штам і потребує дорожчого поживного середовища (173,54 грн), проте тривалість та умови культивування суттєво не відрізняються від інших штамів: 24 год при 37°C, а концентрація життєдіяльних клітин має найвищий показник - $2,3 \times 10^{10}$ КУО/мл, або 7 г/л. Тому для подальшої роботи пропонується використовувати штам *Lactobacillus. fermentum* F6.

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Lactobacillus fermentum F6 паличкоподібні (товсті короткі палички), довжиною 0,5–0,9 мкм, нерухливі. Грам-позитивна, не утворююча спор бактерія. Можуть ставати грам-негативними з віком і при підвищенні

кислотності. При фарбуванні за Грамом або метиленовим синім виявляються біполярні тільця та зернистість цитоплазми. [23, 24, 25].

На *рис. 2.1* зображено як виглядають колонії *Lactobacillus fermentum* F6 на МРС агарі. Колонії зазвичай круглі, опуклі, гладенькі частіше непрозорі з рівними чіткими контурами. Не пігментовані, білі або бежеві [23].



Рис. 2.1. Морфологія колоній *Lactobacillus fermentum* F6 на агаризованому середовищі [24,25]

На середовищах з білками чи ліпідами зони просвітлення коло колоній не утворюються. Володіють слабкою протеолітичною активністю і слабкою ліполітичною активністю. При посіві на тверде поживне середовище утворюються щільні колонії виглядом правильних лінз, трикутної форми і неправильної форми. Якщо в середовище додати крейду, то коло колоній внаслідок утворення накопичення молочної кислоти утвориться зона розчинення крейди [23].

При зростанні на рідких поживних середовищах лактобацили найчастіше викликають рівномірне помутніння, незабаром після припинення росту осідаючи у вигляді рівного гомогенного, рідше пластівчасті осаду, ніколи не утворюючи плівок на поверхні середовища [23].

Фізіологічною особливістю лактобактерій є їх кислотостійкість. Для зростання лактобацил найбільш сприятливі злегка підкислені середовища з

початковим рН 5,4-6,4, причому зростання культури сповільнюється при досягненні рН 3,6-4,0 [23].

Ще одна відмінна риса цієї групи мікроорганізмів - це їх спиртостійкість. Вони здатні розвиватися в поживних субстратах при високих концентраціях етилового спирту (18-24% об.) [23].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для *Lactobacillus fermentum* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [26].

Домен – *Bacteria*

Відділ – *Firmicutes*

Клас – *Bacilli*

Порядок – *Lactobacillales*

Родина – *Lactobacillaceae*

Рід – *Lactobacillus*

Вид – *Lactobacillus fermentum*.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у біомасі *Lactobacillus fermentum*

Життя в сучасному суспільстві диктує свої правила, і людський організм намагається підлаштуватися під них, відповідно, в першу чергу страждає система органів травлення. Причинами захворювань шлунково-кишкового тракту є недоброякісна їжа, зловживання алкоголем, паління, безконтрольний прийом лікарських засобів [27].

Хвороби органів травлення часто призводять до тривалої непрацездатності, тягнуть за собою великі витрати, необхідністю дорогого лікування та реабілітації, тому профілактика і протирецидивне лікування цієї патології є не тільки медичною, а й соціальною проблемою [28].

У структурі поширеності захворювань в Україні патології ШКТ знаходяться на третьому місці, у структурі смертності – на четвертому [29].

Вирішенням цієї проблеми є використання так званих еубіотиків (пробіотиків) — біологічно активних добавок, які містять живі мікроорганізми, що нормалізують мікрофлору кишківника. Одним з найпоширеніших мікроорганізмів в складі БАДів є молочнокислі бактерії [30].

Причиною використання молочнокислих бактерій для лікування хвороб органів травлення є те, що вони одна з найчисельніших груп мікроорганізмів ШКТ. Важливим фактором слугує їхня здатність продукувати велику кількість молочної кислоти, чим сприяють розвитку інших видів мікроорганізмів, таких як *Bifidobacteria*, *Propionibacteria*, *Butyriuvibrio*, *Roseburia*. Також молочнокислі бактерії підтримують ферментативне бродіння та утворення органічних кислот, як наслідок знижується рівень рН у товстому відділі кишечника, зменшується кількість сальмонел та інших хвороботворних мікроорганізмів [11].

					НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Максимець О.О.			РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					22	142
Консультант						Кафедра БТМ ²⁴		
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Видам *Lactobacillus*, що населяють ШКТ, приділяється найбільша увага завдяки їх властивостям позитивно впливати на стан організму, виживати в середовищі шлунку і кишківника, утримуватися на клітинах епітелію, а також забезпечувати колонізаційну резистентність [31].

У шлунку лактобацили виявляються в кількості 10^3 КУО / мл, в тонкому й підвздошному кишківнику їх кількість знаходиться в межах 10^2 - 10^5 КУО / мл [32].

Лактобактерії – це міжнародна непатентована назва (МНН) лікарського засобу. За фармакологічним вказівником лактобактерії відносяться до групи «Засоби, які нормалізують мікрофлору кишечника». За АТХ лактобактерії включені в групи:

- Протидіарейні препарати, код A07FA01. Мікроорганізми, які продукують молочну кислоту;
- Антисептики і протимікробні препарати для лікування гінекологічних захворювань, код G01AX14. Лактобацили [5].

Один з найдосліджуваніших видів лактобацил є *Lactobacillus fermentum*, що входить до списку таксономічної одиниці, запропонованою Європейською безпекою харчових продуктів (EFSA 2007) для кваліфікованої презумпції статусу безпеки (QPS) [33].

Використання біомаси бактерій *Lactobacillus fermentum* має ряд переваг: як лікарський препарат сприяє зменшенню розвитку ожиріння, змінюючи спосіб обробки енергії в організмі. Це свідчить про потенціал створення мікробіому, що розщеплює жир, заселяючи кишечник захисними бактеріями та запобігаючи розмноженню патогенних бактерій (стафілококи, токсичні ентеробактерії та поширені в лікарні інфекції, такі як *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*). Також *L. fermentum* виявляє протимікробні та антиоксидантні властивості. Бактерія корисна для підтримки ремісії та запобігання рецидиву виразкового коліту [34].

Було встановлено, що *Lactobacillus fermentum* зменшує ріст шкідливих бактерій, що асоціюється з корисними властивостями, зменшуючи ризик розвитку колоректального раку прямої кишки [33].

Різні види і штами лактобацил широко використовуються в складі ліків, в тому числі, пробіотиків, у складі БАДів для лікування дисбактеріозів різної етіології, захворювань порожнини рота, урогенітальної сфери, шлунково-кишкових розладів [35].

Біомаса *Lactobacillus fermentum* входить до складу вітчизняних монокомпонентних препаратів (йогурт Postantibiotic), та багатокомпонентних: «Симбітер-форте», «Ековаг», «Феміваг» [36, 37].

На фармацевтичному ринку України в недостатній кількості представлені монокомпонентні лікарські засоби, тому слід відмітити, що такі препарати як «Фарманекс Про-Бі», «Лактанза» імпортуються з інших країн.

Особливістю препарату «Фарманекс Про-Бі», є те, що він містить лише живу культуру резистентних до кислого середовища шлунку бактерій *L. fermentum*. Завдяки тому, що бактерія має високу адгезію до слизистих оболонок, це сприяє утворенню поверхневого захисного біошару на стінках кишечника [12].

Препарат «Фарманекс Про-Бі» застосовують в якості біологічно активної добавки до їжі - додаткового джерела пробіотичних лактобактерій. Застосовувати препарат необхідно для профілактики і лікування дисбактеріозу, в тому числі асоційованого з прийомом антибіотиків, при лікуванні запальних захворювань шлунково-кишкового тракту (ентеритів, колітів), алергічних реакцій та синдрому роздратованого кишечника [12].

Лікування хворих з хронічною патологією тонкої кишки є на сьогодні невирішеним міждисциплінарним питанням внутрішньої медицини, інфекційних та хірургічних хвороб. Хронічний ентерит (ХЕ) визначається як поліетіологічний дистрофічний процес тонкої кишки зі зниженням бар'єрної функції, порушенням перетравлювання і всмоктування, заселенням верхніх відділів великою кількістю мікроорганізмів [38].

Останнім часом в Україні дуже гостро постає проблема дисбактеріозу різної етіології. За даними статистики, із проблемою дисбактеріозу постійно стикається 80-90% людей різних соціальних та вікових груп [39].

Синдром подразненого кишечника (СПК) – це хронічне захворювання товстої кишки, широко поширене в світі: за даними досліджень воно зустрічається у 25% населення планети. Рівень захворюваності та поширеності в Україні складає 1,4 на 1000 дорослого населення [40].

Слід відмітити, що біомасу *Lactobacillus fermentum* використовують не тільки для лікування і профілактики шлунково-кишкових захворювань, а й для лікування маститу та лактостазу. Лактостаз - застій молока в одній або декількох сегментах молочної залози. Довготривалий лактостаз може бути причиною маститу - запалення молочної залози [41].

Для відновлення нормальної мікрофлори молочної залози слід використовувати препарат «Лактанза», що являє собою біологічно активну добавку до їжі на основі *Lactobacillus fermentum*. Розмножуючись в протоках молочних залоз, бактерія сприяє зниженню концентрації хвороботворних бактерій, відновлює і підтримує баланс фізіологічної мікрофлори молочної залози. Таким чином, застосування біомаси *Lactobacillus fermentum* зменшує ризик виникнення маститів і робить грудне вигодовування більш зручним та безболісним [42].

Варто відмітити, що корисні властивості *L. fermentum* застосовують не тільки у складі лікарських засобів. Широке значення бактерія має також у харчовій та косметологічній галузях.

Використання цієї бактерії у складі харчових продуктів має позитивні наслідки, завдяки її здатності синтезувати екзополісахариди. Це все завдяки їх корисній ролі в поліпшенні фізичних, реологічних та сенсорних властивостей ферментованого молока, такого як дахі, йогурт, ласі та пахта [33].

L. fermentum є домінуючим видом LAB для сорго, з якого виробляють алкогольний солодовий напій, який характеризується двоступеневим молочнокислим шляхом алкогольного бродіння [33].

Штами *L. fermentum*, які використовують у заквасках, збагачують *in situ* вміст рибофлавіну у ферментованих продуктах зернового походження. Виробництво молочної кислоти призводить до зниження значення рН в кишечнику, при якому ріст патогенних мікроорганізмів зменшується [33].

Сучасним та іноваційним підходом є використання біомаси *L. fermentum* у формі ферментативних лізатів у косметології. Препарати з використанням лізатів мають унікальні властивості: підвищують неспецифічну імунний захист шкіри, підсилюють її регенераційні здатності, звільняють від продуктів обміну речовин. Прикладом такого застосування є «ЛактоЛіз», що містить від 6 до 8 штамів лактобактерій видів: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Str. thermophilus* [43].

Враховуючи всі вищенаведені переваги використання *Lactobacillus fermentum* у різних галузях промисловості, можна сказати, що біомаса лактобацил може бути використана на фармацевтичному ринку України та за кордоном.

3.1.1. Розрахунок річної потреби у цільовому продукті

Для розрахунку річної потужності виробництва за основу беремо одержання біомаси для еубіотика «Фарманекс Про-Бі».

Згідно статистичних даних, станом на 2017 рік кількість хворих на хвороби органів травлення становила 1087155 осіб [44].

Біологічно активна добавка «Фарманекс Про-Бі» випускається у формі прозорих капсул. Вміст капсул - порошок майже білого кольору, масою 344 мг. 1 капсула містить *Lactobacillus fermentum* - 30-90 мг. Допоміжні речовини: целюлоза мікрокристалічна - 174-234 мг, стеаринова кислота - 6 мг, кремнію діоксид - 4 мг. Склад оболонки капсули: гідроксипропілметилцелюлоза, вода, карагенан, калію хлорид [12].

Спосіб застосування та дози: дорослим приймати по 1 капсулі 1 раз на день під час їжі, запиваючи склянкою води. Тривалість прийому - 1 місяць [12].

При подальших розрахунках слід взяти до уваги, що в 90 мг біомаси міститься 30% захисного середовища. Зробивши перерахунок отримаємо 60 мг біомаси і 30 мг захисного середовища.

Доза для хворих: 60 мг.

Курс лікування: 1 доза на добу протягом 30 днів.

Потреба на курс:

$P_{дг} = 1 \text{ дз} \times 60 \text{ мг} \times 30 \text{ дн} \times 1087155 \text{ хв} = 1957 \text{ кг}$.

Узагальнені дані про потребу населення України у біомасі *Lactobacillus fermentum* для лікування та профілактики хвороб органів травлення наведено у табл.3.1.

Таблиця 3.1

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в біомасі *Lactobacillus fermentum* для одержання еубіотика «Фарманекс Про-Бі»

Захворювання (профілактика)	Доза препарату, мг	Доза біомаси, мг	Кількість прийомів капсул на добу	Кількість хворих за 2017 р	Тривалість прийому, днів	Кількість біомаси на 1 людину, мг	Загальна необхідна кількість біомаси, кг
Хвороби органів травлення	344	60	1	1087155	30	1800	1957

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Країна та виробник біологічно активної добавки «Фарманекс Про-Бі» - Deseret Laboratories_(США). Так, як в Україні нема підприємств, що випускають БАД в складі якого міститься лише біомаса *L.fermentum*, даний препарат поставляється з-за кордону. Але при розрахунках слід врахувати, те що ХОТ виліковуються багатоштамовими препаратами українських виробників та імпорфтними засобами. З діаграми (рис.3.1) можемо побачити, що лише 28% припадає на вітчизняних виробників. Також беремо до уваги, що біомасу *L. fermentum* в Україні можна використовувати в харчовій та косметологічній промисловості [12, 45].

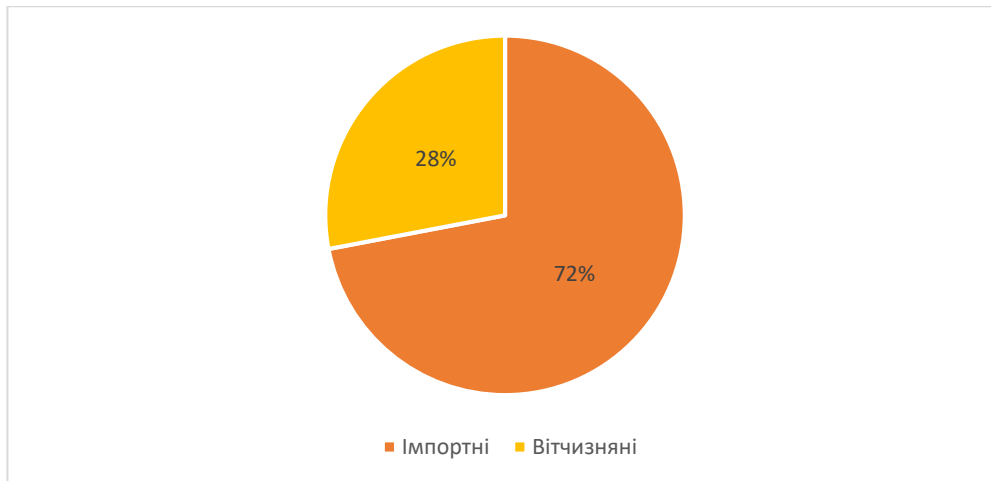


Рис.3.1. Структура ринку БАДів в Україні на 2019 р [45].

З попередніх розрахунків був вибраний біологічний агент *Lactobacillus fermentum* F6, продуктивність якого становить $P_{кр} = 7 \text{ г/л} = 7 \text{ кг/м}^3$ культуральної рідини.

Плануємо, що вибрану кількість субстанції будемо виробляти $T_{рд} = 280$ робочих трудоднів. Для подальших розрахунків необхідно знати тривалість виробничого циклу $T_{ф} = 24$ год.

Субстанцію БАДу отримують з сухою залишковою вологою $W = 3\text{-}5\%$, отже сухої речовини в продукті буде $CP = 0,96$.

Враховуючи всі вищезазначені фактори, визначимо потребу у біомасі *L.fermentum* при реалізації даного проекту не більше 8%.

Отже, потужність виробництва складе:

$$G_{нт} = 1957 \times 0,08 = 157 \text{ кг.}$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Згідно з ТЕО потреба у біомасі *L.fermentum* складає $G_{нт} = 157$ кг. За умовами, цю кількість біомаси потрібно виробити за $T_{рд} = 280$ днів. За літературними даними максимальний синтез біомаси ($P_{кр} = 7 \text{ г/л}$ за $T_{ф} = 24$ год культивування) досягається за умов росту штаму *Lactobacillus fermentum* F6. Відповідно до ТУ вміст сухих речовин в готовому продукті $CP_{нт} = 0,96$.

Для проведення подальших розрахунків приймемо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера $T_{цф} = T_{ф} + T_{по} = 24 + 10,5 = 34,5$ год, де $T_{ф}$ - час

культивування; $T_{по}$ - час проведення підготовчих операцій; коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1-1,5) $K_1= 1,1$. Сумарні втрати при виділенні готового продукту, такі як центрифугування- 5%, ліофільне сушіння- 5%, подрібнення- 3%, просіювання- 3%, пакування, маркування-4% (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту) $E_{св}=0,2$.

Кількість продукту на добу ($V_{нтл}$) становитиме:

$$G_{нтд} = G_{нт} / T_{рд} = 157/280 = 0,561 \text{ кг/добу.}$$

Кількість біомаси за цикл:

$$G_{цк} = G_{нтд} \cdot T_{цф}/24 = 0,561 \cdot 34,5/24 = 0,806 \text{ кг/цикл.}$$

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл) з врахуванням втрат при виділенні готового продукту, а також за рахунок можливих нестерильних операцій:

$$V_{кр} = K_1 \cdot G_{цк} \cdot CP_{гп} / P_{кр} (1 - E_{св}) = 1,1 \cdot 0,806 \cdot 0,96/7(1 - 0,2) = 0,152 \text{ м}^3.$$

Кількість ферментацій (циклів) за рік:

$$N_{цк} = G_{нт} / G_{цк} = 157/0,806 = 194,8. \text{ Прийmemo 195 циклів.}$$

Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

Кількість поживного середовища (ПС) та посівного матеріалу (ПМ) в ферментері до культивування становить:

$$V_{ф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 0,152 / (1 - 0,1) = 0,169 \text{ м}^3.$$

Кількість поживного середовища в ферментері складе:

$$V_{пс} = V_{ф} / (1 + X_{ф}) = 0,169 / (1 + 0,1) = 0,154 \text{ м}^3.$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву ферментера:

$$V_{пмф} = V_{ф} - V_{пс} = 0,169 - 0,154 = 0,015 \text{ м}^3.$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_3=0,7$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе $V_{гф} = V_{ф} / K_3 = 0,169 / 0,7 = 0,241 \text{ м}^3$.

За таблицею (методичка) обираємо ферментер геометричним об'ємом $0,25 \text{ м}^3$.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу біомаси *Lactobacillus fermentum*

За виробничий цикл отримують $V_{кр}=0,152 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10-15%.

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

$$V_{роб.1} = V_{кр}/(1-E_{\phi}) = 0,152/(1 - 0,1) = 0,169 \text{ м}^3.$$

E_{ϕ} – витрати культуральної рідини під час біосинтезу. Виробничий біосинтез здійснюється в ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 0,169 \text{ м}^3$. При вибраному коефіцієнті заповнення $K_3=0,7$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера, що становить:

$$V_{\phi} = V_{роб.1} / K_{зап} = 0,169/ 0,7 = 0,241 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф}= 0,25\text{м}^3$ (методичка), та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення: $K_{зап1} = V_{роб.1} / V_{сф} = 0,169/0,25 = 0,68$.

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно. Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1}/(1+X_{\phi}) = 0,169/(1+0,1) = 0,154 \text{ м}^3,$$

де $X_{\phi}=0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментеру. Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 0,169 - 0,154 = 0,015 \text{ м}^3.$$

Для одержання $0,015 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованої суміші газів які становлять 10 – 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1}/(1-E_{па}) = 0,015/(1-0,1) = 0,017 \text{ м}^3.$$

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

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 0,017 / (1 + 0,1) = 0,0154 \text{ м}^3,$$

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

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 0,017 - 0,0154 = 0,0016 \text{ м}^3 \text{ або } 1,6 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.2}} = 0,017 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{\text{па2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап}} = 0,017 / 0,7 = 0,024 \text{ м}^3.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат $V_{\text{сф}} = 0,03 \text{ м}^3$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{з1}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сф}} = 0,017 / 0,03 = 0,56$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не лежить в заданих межах (0,6 – 0,75), замовляємо у виробника інший геометричний об'єм посівного апарату - $0,025 \text{ м}^3$. Тоді коефіцієнт заповнення $K_{\text{з1}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сф}} = 0,017 / 0,025 = 0,68$.

Кількість інокуляту для засіву посівного апарату $V_{\text{пм2}} = 1,6 \text{ л}$ можна одержати культивуванням бактерій у колбах в термостаті. Для цього використовують колби $V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,6$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм2}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}) = 1600 / (750 \times 0,6) = 3,5$$

Таким чином для одержання посівного матеріалу необхідно 4 колби.

Загальна схема приготування посівного матеріалу *Lactobacillus fermentum* F6 наведена на рис. 3.2.

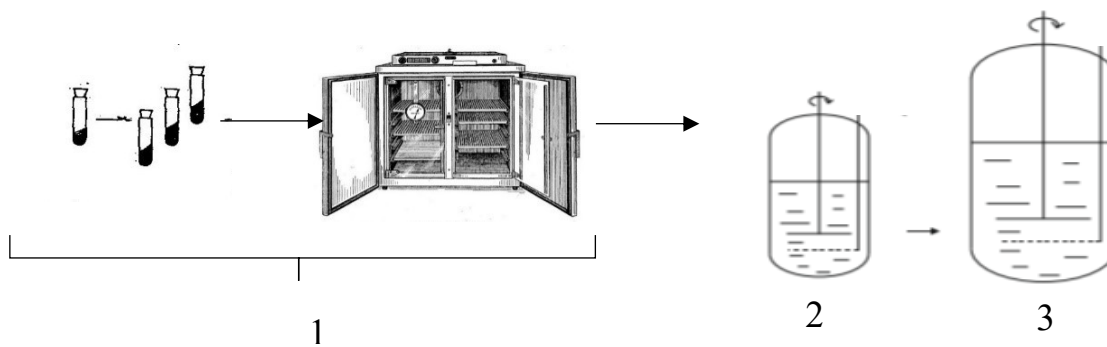


Рис.3.2. Схема приготування посівного матеріалу *Lactobacillus fermentum* F6

- 1- вирощування у лабораторії (у колбах та у термостаті);
- 2- вирощування у посівному апараті об'ємом 0,025 м³.
- 3- вирощування у ферментері об'ємом 0,25 м³.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу біомаси *Lactobacillus fermentum* у ферментері об'ємом 0,25 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,7 буде проходити у 3 етапи.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Ростовим субстратом для біосинтезу біомаси *Lactobacillus fermentum* F6 є сахароза. За допомогою Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes можна знайти шлях катаболізму ростового субстрату [46].

Згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes катаболізм сахарози у *Lactobacillus fermentum* F6 відбувається шляхом перетворення ростового субстрату ферментом фосфотрансферазою (КФ 2.7.1.211) на сахарозо-6-фосфат, який під дією фермента бета-фруктофуранозидази (КФ 3.2.1.26) розщеплюється на глюкозо-6-фосфат та фруктозу. Далі фруктоза ферментом фруктокіназою (КФ.2.7.1.4) перетворюється на фруктозо-6-фосфат, який ізомеразою (КФ 5.3.1.9) утворює глюкозо-6-фосфат (реакція оборотна). Далі фосфоглюкомутазою (КФ 5.4.2.2) глюкозо-6-фосфат розщеплюється до глюкозо-1-фосфат (реакція оборотна). Фруктозо-6-фосфат залучається у пентозофосфатний шлях з утворенням еритрозо-4-фосфату та рибозо-5-фосфату ферментом транскетолазою (КФ 2.2.1.1). Далі ферментом трансальдолазою (КФ 2.2.1.2) залучається гліколіз (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса) [47, 48, 49].

До подальшого катаболізму залучається гліцеральдегід 3-фосфат, під дією гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) він перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у 3-фосфогліцерат. Дія 2,3-бісфосфогліцерат-залежа фосфогліцерат мутази (КФ 5.4.2.11) на 3-фосфогліцерат індукує його перетворення на 2-фосфогліцерат. Під дією фосфопіруват гідратази (КФ 4.2.1.11) 2-фосфогліцерат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40) (рис. 4.1, додаток 4) [48].

					НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Максимець О.О.			РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					33	142
Консультант						Кафедра БТМ ³⁵		
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

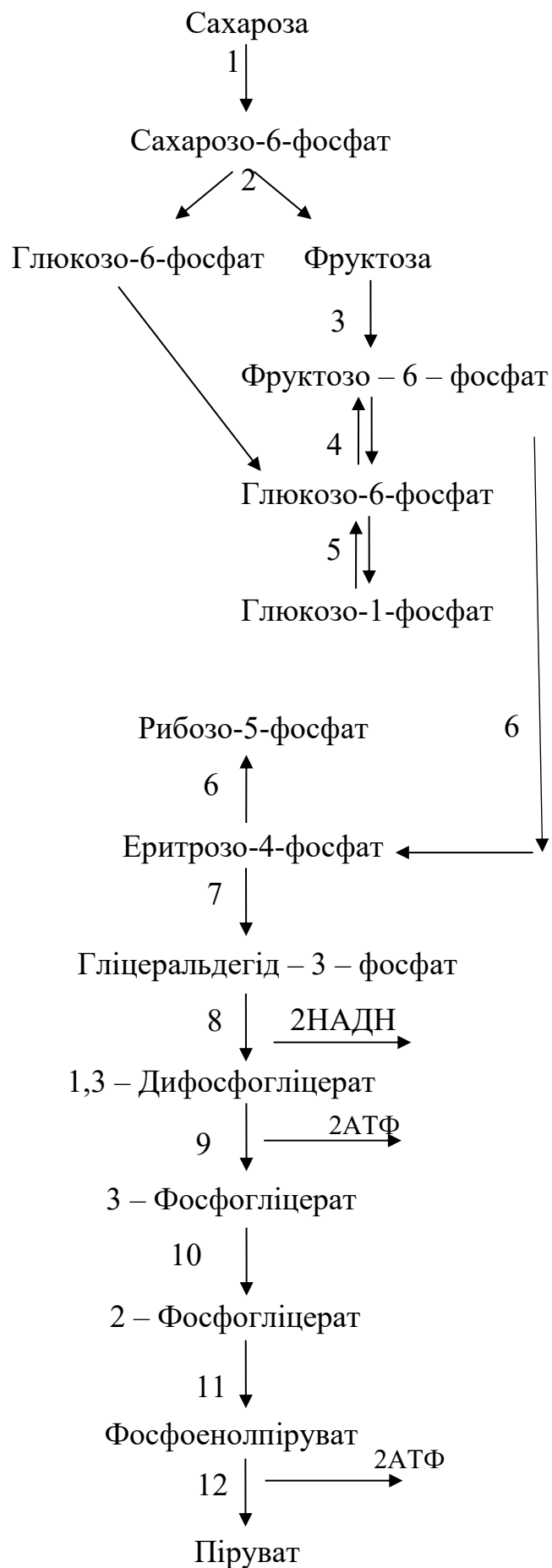


Рис 4.1. Шлях катаболізму сахарози у *Lactobacillus fermentum* F6

Ферменти: 1-фосфотрансфераза (КФ 2.7.1.211); 2 – бета-фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26); 3 – фруктокіназа (КФ 2.7.1.4); 4 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 5- фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 6 – транскетолаза (КФ 2.2.1.1); 7 – трансальдолаза (КФ 2.2.1.2); 8 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 9 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 10– 2,3-бісфосфогліцерат-залежна фосфогліцерат мутаза (КФ 5.4.2.11); 11– фосфопіруват гідратаза (КФ 4.2.1.11); 12 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Для накопичення біомаси *Lactobacillus fermentum* F6 необхідно щоб з ростового субстрату утворилися необхідні для побудови клітин елементи (нуклеїнові кислоти, білки, полісахариди та ліпіди) [46].

При використанні сахарози, як джерела вуглецю, внаслідок її катаболізму утворюється фруктозо-6-фосфат з якого починаються реакції синтезу пептидоглікану. Послідовними перетвореннями з використанням амінокислоти глутаміну утворюється глюкозамін-6-фосфат, а потім глюкозамін-1-фосфат. За участі ацетил-КоА синтезується N-ацетилглюкозамін-1-фосфат, УДФ- N-ацетилглюкозамін, який разом з ФЕП утворює УДФ-N-ацетилмурамову кислоту, з якої утворюється пептидоглікан.

Гліцеральдегід-3-фосфат залучається до синтезу ліпідів, перетворюючись на діоксиацетонфосфат, потім на 3-фосфогліцерин, який разом з ацил-АПБ утворює ацил-3-фосфогліцерин. Далі знову залучається ацил-АПБ, який синтезує діацил-3-фосфогліцерин з якого синтезуються гліколіпіди, фосфоліпіди. Для завершення утворення ліпідів у бактерій необхідні ще жирні кислоти, які утворюються з ацетил-КоА.

Для утворення білків необхідно насинтезувати усі 20 амінокислот.

Фруктозо-6-фосфат залучається до пентозофосфатного циклу, в якому утворюються попередники ароматичних амінокислот – фосфорибозил-1-пірофосфат (з рибозо-5-фосфату) (попередник гістидину) і еритрозо-4-фосфат. Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват є попередниками фенілаланіну, тирозину і триптофану.

Ще одним інтермедіатом гліколізу є 3-фосфогліцерат, який є попередником утворення деяких амінокислот піруватної родини (серин, гліцин, цистеїн). Інші амінокислоти піруватної родини (аланін, валін, лейцин) утворюються з пірувату, який є також інтермедіатом гліколізу. Піруват утворюється з фосфоенолпірувату за допомогою піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

Далі ацетил-КоА залучається до ЦТК, проміжні сполуки якого є попередниками амінокислот аспартаної та глутаматної родини.

Амінокислоти аспартатної родини (аспартат, аспарагін, метіонін, треонін) утворюються з оксалоацетату. Лізин утворюється через оксалоацетат та аспартат. Ізолейцин утворюється з залученням оксалоацетату та пірувату.

Амінокислоти глутаматної родини (глутамат, глутамін, пролін, аргінін) утворюються з 2-оксоглутарату (інтермедіату ЦТК).

Для утворення нуклеїнових кислот необхідно синтезувати УТФ, ЦТФ, АТФ та ГТФ.

Фосфорибозил-1-пірофосфат з пентозофосфатного циклу перетворюється на імідазольний нуклеотид і в подальшому за допомоги формілтетрагідрофолієвої кислоти, аспартату та HCO_3^- утворюється інозитмонофосфат, послідовними реакціями утворюючи АТФ та ГТФ.

УТФ та ЦТФ синтезуються з карбамоїлфосфату, який разом з аспартатом утворюють карбамоїласпартат, який циклізується у 4,5-дигідрооротат. Дана сполука перетворюється на оротат, далі на оротидинмонофосфат, який сполучається з фосфорибозил-1-пірофосфатом з утворенням УМФ. УМФ утворює УДФ, а подалі отримуємо необхідні УТФ та ЦТВ.

Анаплеротичними реакціями, які забезпечують поповнення втрат інтермедіатів ЦТК – попередників біосинтезу амінокислот, при рості на сахарозі є реакції карбоксилювання пірувату та фосфоенолпірувату з утворенням оксалоацетату.

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

У біотехнологічному процесі створення лікувально-профілактичних пробіотиків велику увагу приділяють досягненню максимального рівня виходу біомаси життєздатних клітин бактерій та відповідно синтезованих ними біологічно активних речовин, також важливо при підборі штамів враховувати їх технологічність у виробничих умовах і стабільність при культивуванні з урахуванням збереження пробіотичних властивостей. Ці показники визначають продуктивність, конкурентоздатність і рентабельність технологічного процесу [50].

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Один з етапів виготовлення пробіотичного препарату – отримання достатнього обсягу бактеріальної маси. Для цих цілей мікроорганізми, як правило, вирощують за допомогою глибинного культивування. Цей спосіб має ряд очевидних переваг перед вирощуванням бактерій на щільних поживних середовищах. По-перше, постійно відбувається перемішування біомаси. По-друге, більш раціонально використовуються поживні речовини середовища, з'являється можливість автоматизувати процес культивування [21].

Глибинний спосіб культивування обумовлений тим, що всі штами *L. fermentum* є факультативними анаеробами, температурний оптимум $37\pm 2^\circ\text{C}$, ростуть при 42°C , помітно слабкий ріст при 30°C . Хоча більшість штамів аеротолерантні, оптимальними для росту є анаеробні і мікроаерофільні умови. Підвищена концентрація вуглекислого газу ($\approx 5\%$) може стимулювати їх ріст [21, 51].

					НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Максимець О.О.			РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					37	142
Консультант						Кафедра БТМ ³⁹		
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

При одержанні пробіотиків важливою є сама біомаса, тому при культивуванні потрібно притримуватися стаціонарної фази росту, що досягається періодичним культивуванням. Відомо, що в умовах періодичного культивування доза посівного матеріалу впливає на швидкість накопичення біомаси та забезпечує високий економічний коефіцієнт [52].

Lactobacillus fermentum – гетероферментативний вид і утворює з 1 моля глюкози крім 1 моля молочної кислоти, 1 моль етилового спирту (або оцтової кислоти) і 1 моль вуглекислого газу, використовуючи окислювальний пентозофосфатний шлях розщеплення глюкози [21].

Те, що мікроорганізм утворює ці кислоти, обумовлює його антагоністичні властивості. На думку ряду дослідників, саме утворення зазначених органічних кислот з вуглеводів призводить до зниження рН середовища і запобігає розвитку інших мікроорганізмів [21,53].

Виходячи з цього можна сказати, що при культивуванні рН середовища буде знижуватися і унеможливлуватися контамінація іншими мікроорганізмами. Але перед культивуванням все ж таки необхідно провести стерилізацію обладнання (інокуляторів, ферментерів), поживних середовищ та розчину титрувального агента.

Оскільки під час споживання субстрату утворюються органічні кислоти та спирти, що спричиняють підкислення середовища необхідно використовувати розчин лугу (NaOH 6%-ий).

Лактобацилли – хемоорганогетеротрофи, тобто дуже вимогливі до джерел живлення, потребують багатих складних середовищ з вуглеводів (глюкоза, лактоза, рибоза, ксилоза). Це означає, що при підготовці поживного середовища потрібно врахувати наявність вуглеводів. Для культивування бактерій роду *Lactobacillus* використовуються середовища, багаті поживними речовинами (дріжджовий екстракт, гідролізат обрата (знежиреного) молока, пептони, Твін-80), різними солями, в тому числі ацетатом натрію і ін. і мають низький рівень рН (4,5-6,2) [54].

Зі спеціальних поживних середовищ найбільш широке поширення отримано середовище MPC (MRS) - середовище de Man, Rogosa, Sharp. Серед багатих поживними речовинами і ростовими факторами, середовище, що містить дріжджовий і м'ясний екстракти, сахарозу, пептони, ацетат натрію, цитрат амонію і Твін-80 - джерело жирних кислот, необхідних для метаболізму лактобактерій [54].

Отже, культивування *Lactobacillus fermentum* F6 має проводитися глибинним способом у ферментерах з високим коефіцієнтом заповнення, з помірною аерацією, так як мікроорганізм - мікроаерофіл. Низьке значення рН під час культивування нейтралізуємо розчином лугу. Всі операції проводимо в асептичних умовах.

Глибинне культивування проводять у вертикальних герметичних ємностях різного розміру, що називаються ферментерами [55].

Щоб процес культивування пройшов успішно, необхідно забезпечити стерильність обладнання. Для дотримання цієї вимоги ферментатор повинен витримувати жорстку стерилізацію і працювати протягом всього культивування під невеликим надмірним тиском. Для підтримання стерильних умов ферментер має бути абсолютно герметичними (ущільнення валу), а всі лінії трубопроводів мають бути доступні до обробки гарячою парою [55].

Біореактор має бути також обладнаний арматурою та трубопроводами для подачі живильного середовища, води, пари, розчину, що регулює рН. Дуже важливо переконатися, що у ферментаторі забезпечуються асептичний режим культивування, дотримання всіх параметрів зростання мікроорганізму і створюються сприятливі умови біосинтезу цільового продукту [55].

Велике значення для продуктивного культивування та максимального накопичення біомаси має комплекс фізичних і фізико-хімічних факторів (рівень рН, температура.). Тому в ферментері обов'язково повинна бути контрольна-вимірююча апаратура [54].

Для здійснення мікроаерофільних умов, необхідно щоб до ферментера була підведена труба для подачі аераційного повітря. Тиск в апараті має бути

в межах 0,01-0,3 МПа, для того щоб контролювати мікроаерофільні умови. Отже, апарат має бути оснащений манометром (для контролю тиску).

Оптимум рН для *L. fermentum* перебуває у межах 5,4 – 6,5 та під час культивування знижується, а температура культивування 37°C, тобто наявність рН-метра та термометра є необхідністю.

Щоб відбувалася інтенсифікація масообміну потрібне перемішування. При вирощуванні лактобацил на рідких поживних середовищах глибинним способом рекомендується використовувати лопатеві мішалки, так як вони прості за конструкцією. Як правило, лопатеві мішалки низькооборотні (частота обертів 100 об/хв), з двома лопатками. Ці мішалки використовуються, для мікроорганізмів, що не утворюють міцелій та коли немає необхідності в інтенсивній циркуляції рідини в апараті. В конструкції потрібні відбивні перегородки, щоб не утворювалася воронка при перемішуванні та датчик для контролю швидкості перемішування [54,55].

Ферментер повинен бути оснащений рубашкою з гарячим теплоносієм, в якості якого обрано водопровідну гарячу воду, щоб підтримувати сталу температуру. Сорочка має мати штуцери для вводу і виводу теплоносія [56].

5.1.2. Обґрунтування вибору стадій підготовки аераційного повітря

Молочнокисла бактерія *Lactobacillus fermentum* F6 - факультативний анаероб, це означає що, мікроорганізм здатен отримувати енергію із субстратів аеробним і анаеробним шляхом біологічного окиснення. Метаболізм цієї бактерії може здійснюватися як в умовах повного доступу кисню в середовище, так і в умовах відносного анаеробіозу. Але найбільшу кількість біомаси бактерія виробляє при мікроаерофільних умовах культивування [57].

Беручи до уваги все вищесказане, можна зробити висновок, що підготовка стерильного аераційного повітря при культивуванні штаму *L. fermentum* F6 є однією з основних задач на біотехнологічному виробництві.

Так як об'єм апарату має невеликі об'єми (250 л), то підготовка аераційного повітря здійснюватиметься в окремому приміщенні.

Підготовка очищеного аераційного повітря включає декілька стадій, а саме:

- забір повітря з атмосфери здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником у найвищій точці ($H \approx 3$ м) будівлі, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря;
- очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) на плоских тканинних фільтрах грубого очищення;
- стиснення повітря в компресорах. Повітря нагрівається до температури 120–200 °С - відбувається стерилізація повітря;
- охолодження стисненого повітря до температури «точки роси», за якої волога повітря конденсується;
- видалення конденсованої вологи у ресивері. Ресивер зменшує пульсації руху повітря;
- стабілізацію термодинамічних показників (тиск, температура) відбувається підігріванням до температури 45–50 °С паром у відповідних теплообмінниках;
- очищення в індивідуальних фільтрах. Повітря з головних фільтрів потрапляє до індивідуальних фільтрів, що встановлені біля ферментера. Повітря очищають до ступеня очищення $E=99,99\%$.

Повітряні фільтри поділяють залежно від ефективності дії – фільтрувальної здатності на 3 класи:

- грубого очищення (вловлюють частинки розміром більше 10 мкм);
- тонкого очищення (вловлюють частинки розміром більше 1 мкм);
- «абсолютні» фільтри високого очищення [58].

Першим кроком очищення аераційного повітря є фільтри грубого очищення. В якості фільтрів грубої очистки використовують такі фільтри:

- Механічні;
- Масляні;
- Рулонні;
- Кишенькові [59].

Попередню очистку повітря будемо здійснювати фільтра касетного Aerostar SFB 40-20. Клас очистки G4 з 3 карманами. Дані фільтри очищають повітря від твердих і волокнистих часток. Діапазон робочих температур від -40°C до +70 °C. Корпус фільтра зроблений з оцинкованої листової сталі. Змінні фільтруючі вставки мають фільтрувальні матеріали класу G4. Типорозмір 40-20 мм [60].

В якості фільтрів тонкого очищення використовують такі фільтри:

- Вугільні фільтри;
- Губчасті фільтри.

Такі фільтри здатні вловлювати частинки розміром від 10 до 100 мкм. При цьому вони мають клас фільтрації F5-F9. Вони використовуються як другий ступінь очищення повітря в приміщеннях з підвищеними вимогами до чистоти повітря [59].

В ролі фільтра тонкого очищення буде виступати кишеньковий фільтр ФБК 700x400-7, класу очистки F7 з типорозміром 70-40 мм. Фільтруючий матеріал в ньому синтетичне волокно. Корпус виконаний з оцинкованої листової сталі. Даний фільтр обладнаний відкидною кришкою з ваговими замками для швидкого доступу при чистці або зміні фільтруючого елемента [61].

Для зон типів А, В система постачання повітрям повинна мати відповідні фільтри, такі як HEPA - фільтри.

HEPA-фільтр являє собою вискоелективний фільтр нового покоління, призначений для видалення з повітря дрібнодисперсних шкідливих частинок, а також PM2.5 і PM10 (з діаметром менше 2,5 і 10 мкм відповідно). HEPA – це клас, який має свої параметри і має певний ГОСТ ЕН 1822-1:2009 і ГОСТ Р ЕН 1822-1-2010 [62].

Фільтр HEPA модель В56-В04 мають гофровану перегородкову плиту, щоб підтримувати відстань між складками. Фільтруючий матеріал складений на 180 градусів з обох сторін і складений у клиновидну складку, щоб запобігти пошкодженню фільтруючого матеріалу. Фільтр має велику пилозберігаючу

здатність, велику площу фільтрації, великий об'єм повітря, високу ефективність, високу вологостійкість до 100% [63].

5.1.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для отримання максимально можливої біомаси *Lactobacillus fermentum* F6 (7 г/л за 24 год) використовують такий склад поживного середовища (г/л): сахароза - 62; дріжджовий екстракт – 35,5; панкреатичний гідролізат казеїну – 12; лимонна кислота – 1,35 ; цитрат натрію – 22; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,1; Твін-80 – 1,0.

Згідно розрахунків, виробничий синтез біомаси здійснюється у ферментері об'ємом 250 л, що містить 154 л середовища. Одержання інокуляту відбувається у 2 етапи (у колбах в термостаті та посівному апараті об'ємом 25 л).

Проаналізувавши склад поживного середовища для культивування *L.fermentum* F6, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації певних компонентів):

Композиція А: панкреатичний гідролізат казеїну (режим стерилізації: 120°C, 30 хв, 0,1 МПа).

Композиція Б: дріжджовий екстракт, сахароза, твін-80 (режим стерилізації: 112°C, 30 хв, 0,05 МПа).

Композиція В: лимонна кислота, цитрат натрію, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ (режим стерилізації: 131°C, 60 хв, 0,15 МПа).

В складі середовища немає фосфорних солей, виходячи з цього стерилізація наявних солей проходить в одній композиції. Стерилізацію композицій А, Б та В здійснюють в автоклаві, реакторах-змішувачах та безпосередньо у ферментері.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах в термостаті

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати поживне середовище. Джерелом вуглецю в середовищі є сахароза, джерелом азоту – панкреатичний гідролізат казеїну та дріжджовий екстракт.

Приготування і стерилізація композиції А. Панкреатичний гідролізат казеїну розчиняють у холодній водопровідній воді та перемішують щоб суспендувати. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 120°C та тиску 0,1 МПа упродовж 30 хв.

Приготування і стерилізація композиції Б. Сахарозу, дріжджовий екстракт та твін-80 поміщають у колбу та додають воду, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C та тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв.

Приготування і стерилізація композиції В. Цитрат натрію, лимонну кислоту, $MgSO_4 \times 7H_2O$ і $MnSO_4 \times 5H_2O$ поміщають у колбу і додають водопровідну воду, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C та тиску 0,15 МПа протягом 60 хв.

Всі три композиції стерилізують в автоклаві в окремих колбах, тому для стерилізації компонентів обираємо автоклав з вертикальним завантаженням, куди завантажуються по черзі 3 колби з композиціями. Після закінчення процесу стерилізації всі компоненти поживного середовища охолоджують.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах 25 л

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 15,4 л поживного середовища. Для засіву посівного апарату використовуємо рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 1,6 л (10% від загального об'єму). Стерилізація поживного середовища для посівного апарату не потребує перескладання композицій.

Однак, стерилізація композиції А та В відбувається в колбах в автоклаві, композиція Б у окремому реакторі-змішувачі, що встановлений перед посівним апаратом.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері 250 л

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 154 л поживного середовища.

Враховуємо, що для засіву ферментера використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 15 л (10% від загального об'єму середовища) та кількість конденсату, утвореного під час стерилізації поживного середовища в ферментері 23,1 л.

Стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу не потребує перескладання композицій.

Спочатку готуємо композицію А, яку будемо готувати і стерилізувати у реакторі-змішувачі. Панкреатичний гідролізат казеїну розчиняють у холодній водопровідній воді, ретельно перемішують, тому реактор повинен бути оснащений перемішуючим пристроєм. Потім готуємо композицію Б в окремому реакторі-змішувачі, ретельно перемішуючи уникаючи утворення великих грудок, що можуть спричинити нестерильність. Композицію В готують у збірнику, а стерилізують у ферментері. Композиції А та Б перекачують за допомогою відцентрового насоса у стерильний ферментер з готовою композицією В.

5.1.4 Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

Оптимальне рН для *L. fermentum* F6 дорівнює 6,5. Під час виробничого біосинтезу потрібно регулювати рівень рН. Для доведення рН середовища до оптимального, після стерилізації при рН 4,0-4,5, додають 6% NaOH з розрахунком в кількості 0,2 % від об'єму культуральної рідини.

Розчин лугу додаємо в охолоджене поживне середовище в посівний апарат об'ємом 25 л та у ферментер об'ємом 250 л.

Розчин повинен бути стерильним, так як подається у стерильне поживне середовище. Отже, проводимо стерилізацію при температурі 131°C протягом 40 хв при 0,15 МПа.

Під час культивування піна не утворюється, тому використання піногасника виключається

5.2. Обґрунтування стадій виділення цільового продукту

Для виробництва ефективних та якісних пробіотичних препаратів необхідним є ретельний вибір усіх технологічних операцій, які б забезпечили отримання максимальної кількості життєздатних і стабільних при тривалому зберіганні клітин бактерій [64].

«Фарманекс Про-Бі» є препаратом біологічного походження, який регулює рівновагу кишкової мікрофлори. В складі пробіотика міститься жива культура резистентних до кислого середовища шлунку бактерій *Lactobacillus fermentum* [12].

Використовується препарат в якості біологічно активної добавки до їжі - додаткового джерела пробіотичних лактобактерій: для профілактики і лікування дисбактеріозу, (асоційованого з прийомом антибіотиків), терапії запальних захворювань шлунково-кишкового тракту (ентеритів, колітів), алергічних реакцій та синдрому роздратованого кишечника [12].

Лікарська форма засобу має вигляд капсул, всередині яких порошок білого кольору, масою 344 мг, залишковою вологістю 6% та розмірами часток 0,5-0,25 мм. Допоміжні речовини: целюлоза макрокристалічна- 174-234 мг, стеаринова кислота-6 мг, кремнію діоксид- 4 мг. Склад оболонки капсул: гідроксипропілметилцелюлоза, вода, каррагінан, калію хлорид. Застосовується даний пробіотик у клінічній практиці [12].

Пробіотик «Фарманекс Про-Бі» випускається у картонній пачці, всередині якої пластиковий флакон з капсулами кількістю 30 шт [12].

Зважаючи на все вищенаведене, кінцева продукція проєкту є готовою лікарською формою, тому найбільш оптимальна технологічна схема виробництва пробіотичного препарату включає: стадію культивування, відокремлення біомаси від культуральної рідини, стадію додавання захисного середовища до отриманої біомаси, стадію сушіння, подрібнення та просіювання висушеної біомаси, стадію фасування, пакування та маркування цільового продукту.

5.2.1. Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання

Після процесу біосинтезу, отримана культуральна рідина складається із залишків компонентів поживного середовища, метаболітів і біомаси молочнокислих бактерій. З огляду на це, необхідним етапом є відокремлення біомаси від культуральної рідини, адже залишки компонентів поживного середовища та метаболіти можуть погіршити якість готового препарату [64].

Варто пам'ятати, що обладнання для процесу відділення біомаси має бути сконструйоване таким чином, щоб поверхні, які контактують із сировиною, не змінювали характеристики АФІ. Також, зокрема при виробництві пробіотичного препарату, обладнання повинно мінімально впливати на активність, цілісність клітин і кількісний склад бактерій, які підлягають відділенню від культуральної рідини [65].

Завданням стадії концентрування є збільшення вмісту живих клітин молочнокислих бактерій перед сублімаційним сушінням. При цьому загибель клітин при їх концентруванні повинна бути мінімальна, що гарантує високу якість продукції, що випускається.

Залежно від властивостей біомаси й рідини використовують різні процеси:

- Фільтрація: пропускання суспензії крізь фільтруючий матеріал, на якому затримуються частки твердої фази [66].
- Сепарація, центрифугування: розподіл під дією центробіжних сил [66].
- Мікрофільтрація, ультрафільтрація: пропускання суспензії крізь мембрани з малим діаметром пор, котрі забезпечують утримання клітин мікроорганізмів [66].
- Коагуляція: додавання до суспензії реагентів, які допомагають осадженню більш крупних клітинних агрегатів і відділенню їх із рідини шляхом відстоювання. Недоліком є поява досить об'ємних осадів з високою (до 99 %) вологістю, які необхідно утилізувати [66,67].

- Флотація: захоплення біомаси мікроорганізмів кульками піни і виділення їх із пінної фракції. Недоліком даного методу є велика втрата біомаси [66].

Фільтрація. Для отримання бактеріальних клітин з культурального середовища часто використовують два типи фільтрації: осадова і мембранна. Для *осадової фільтрації* використовують високопористі матеріали з глибокими і звивистими порами. При фільтруванні бактерій, по мірі їх накопичення, зіскоблюють з поверхні фільтра. Такий спосіб дозволяє добре очистити фільтрат, але для стерилізації середовищ непридатний, а біомаса часто виявляється забруднена фільтратом. Ще одним недоліком є великі втрати біомаси за рахунок проходження частини клітин через пори фільтруючого матеріалу [68].

На сьогоднішній день відділення біомаси клітин від культуральної рідини і їх концентрування здійснюється двома популярними способами, такими як, центрифугування, що є традиційною технологією, і мікрофільтрацією, здійснювана із застосуванням мікробіологічно стійких мембран з розміром пор від 0,1 до 1,0 мкм [69].

В процесі мікрофільтрації при русі біомаси в напірному каналі мембранного елемента відбувається її концентрування за рахунок видалення частини води з розчиненими в ній речовинами: через пори мікрофільтраційних мембрани проходять розчинені у воді солі, білки, полісахариди, а клітини молочнокислих бактерій, затримуються, утворюючи при цьому потік концентрату. Безумовно, при високих швидкостях під час руху в напірному каналі мембранного елемента в гідродинамічному потоці клітини будуть травмуватися під дією напруги зсуву. Ще одним суттєвим недоліком є налипання клітин на мембрану і подальше її закупорювання, що призводить до поломки обладнання [69].

Концентрування біомаси центрифугуванням ґрунтується на відмінності в щільності клітин і культуральної рідини і відбувається під дією відцентрової сили. Швидкість осадження в процесі центрифугування залежить від таких

факторів, як в'язкість середовища, розмір часток і різниця в щільності між частинками і середовищем. Перевагами даного способу є можливість отримати середовище і клітини, незабруднені фільтратом, повна автоматизація процесу, компактність конструкції, простота обслуговування, безперервність технологічного процесу розділення суспензій, можливість промивки осаду, високий ступінь осушування, велика продуктивність, можливість включення в автоматичні або безперервно діючі технологічні лінії. Недоліки: енергоємність процесу, зношування шнека та ротора [68, 69, 70].

Наступним етапом є підбір параметрів центрифугування. Час центрифугування і число обертів залежать від розмірів клітин. Чим вони менше, тим більше потрібно обертів і тим тривалішим має бути час центрифугування [71].

Lactobacillus fermentum- це молочнокисла бактерія, яка має вигляд товстих коротких паличок довжиною 0,5-0,9 мкм. Порівняємо їх з дріжджами, які мають овальну форму та відносно більші розміри. Середній розмір дріжджової клітини 10-15 мкм. Проаналізувавши всі можливі параметри центрифугування дріжджів, узагальнюємо, що часто використовуваним є - 4000 об/хв упродовж 20 хв [72,73].

Так як розміри клітин молочнокислих бактерій менші, тому обираємо центрифугування на осаджувальній центрифугі зі шнековою вигрузкою осаду при 6000 об/хв 40 хв.

5.2.2. Додавання захисного середовища

Важливим етапом технологічного процесу виробництва пробіотичних препаратів є стабілізація біомаси бактерій після процесу відділення від культуральної рідини з метою захисту клітин від значних змін в їхній структурі на наступних етапах, що можуть супроводжуватись руйнуванням клітин і втратою життєздатності [74].

Найкращим є додавання захисного середовища, яке містить кріо- та ліопротектори (сахароза, трегалоза) [64].

Додавання в середовище допоміжних речовин таких як манітол, знежирене молоко допомагає клітинам краще перенести процес сушки. Додатковим компонентом повинен бути білок, який може бути як рослинного походження (наприклад, соєвий пептон), так і тваринного (наприклад, желатин). Виявлено, що желатин має кращу захисну функцію що впливає на виживання пробіотику. Білок здатний запобігати пошкодженню клітин, утворюючи на клітинній стінці захисне покриття. Тому для захисту клітин пробіотиків пропонується універсальне захисне середовище, яке включає всі необхідні компоненти (сахарозу, сухе знежирене молоко). Для додаткового захисту застосовується желатин, адже в комплексі вони забезпечують збереження достатньої кількості життєздатних клітин [12,75].

Лактобацили демонструють більш високий рівень виживання після ліофілізації, коли до середовища додають сахарозу. Середовище, що містить 8% сахарози, виявляє більшу ефективність, порівняно з її вмістом у 4%. Відсоток виживання близько 17— 19% був виявлений у середовищах, що містять желатин і знежирене молоко. Желатин діяв як захисна речовина та покращував виживання бактерій. Клітини лактобактерій зберігають більшу життєздатність при більш високій концентрації желатину. Відсоток виживання близько 76% був виявлений у середовищі, що містять 6% знежиреного молока, 4% желатину та 8% сахарози. Тому цей варіант середовища є найбільш ефективним [76].

Захисне середовище складає 30% від усієї маси пробіотика, тому для захисту клітин лактобацил пропонується універсальне захисне середовище, яке включає всі необхідні компоненти. В якості захисного середовища обираємо таку суміш:

- 6% знежиреного молока;
- 4% желатину;
- 8% сахарози.

5.2.3. Сушіння

Збереження штамів культур в життєздатному стані без втрати виробничо-цінних властивостей є одним із важливих завдань в біотехнології. Анабіоз як природний процес виживання клітини залишається найбільш ефективним способом консервування бактерій. Тривалість зберігання бактерій, введених в ксероанабіоз, досягає 50 років зі збереженням високої щільності популяцій в препараті [77].

Тривале зберігання бактерій зі збереженням цінних властивостей засноване на пригніченні протікання обмінних процесів в клітині. До таких способів відносяться кріоанабіоз мікроорганізмів і висушування бактерій із замороженого стану (ліофілізація). Ефект консервації при сублімації досягається шляхом зниження активності води шляхом видалення вільної вологи в умовах субнулевих температур [78].

До переваг кріогенного зберігання відносять малу кількість технологічних операцій і контрольних критичних точок, що підвищують ймовірність вторинного обсіменіння культур, забезпечення сталості властивостей мікроорганізмів і доступність компонентів для підготовки захисного середовища. До недоліків даного способу відносять відносно коротку тривалість зберігання. Максимальний рекомендований термін становить 12 міс [78].

Відомі такі методи сушіння:

- Розпилувальна сушарка;
- Сублімаційна сушка (ліофілізація);
- Вакуумна сушка.

Спосіб сушіння розпиленням має низку переваг у порівнянні з іншими методами сушіння. Процес сушки протікає надзвичайно швидко (15-30 с), частки в зоні підвищеної температури мають насичену поверхню, температура якої близька до температури адіабатного випаровування чистої рідини. Завдяки миттєвої сушці і невисокій температурі розпорошених частинок матеріалу висушений продукт виходить хорошої якості [79].

Але варто відмітити, що життєздатність клітин із застосуванням даного способу складає лише 56%, що є недопустимо, коли кінцевим продуктом є біомаса. Розпилювальна сушарка має низьку теплову ефективність і велике споживання тепла, дороговартісне обладнання та займання великої площі [79,80].

Вакуумна сушка представляє собою метод зневоднення при тиску нижче атмосферного, але вище потрібної точки води. Джерелом тепла при цьому можуть служити інфрачервоні лампи нагріву, що гріють поверхні або СВЧ-генератори. Знижений тиск сприяє збільшенню інтенсивності випаровування вологи з продукту. До недоліків даного виду зневоднення можна віднести досить великі енерговитрати і високу вартість обладнання. Цей спосіб сушіння є малоефективним, тому що життєдіяльність клітин після процесу становить лише 37% [81,82].

Найефективнішим способом з вищенаведених є ліофілізація. Висушування біоматеріалів із замороженого стану (ліофілізація, сублімаційне висушування, заморожування-висушування) - широко поширений спосіб, при якому вода випаровується в умовах вакууму без відтавання льоду, що дозволяє повністю зберігати первинну структуру об'єкта сушіння. При використанні даного способу багато фізіологічно різноманітні види бактерій і бактеріофаги вдається зберігати в життєздатному стані 50 років і більше [21].

Перевагами ліофілізації, порівняно з вакуумною та розпилювальною сушаркою, є:

- живі клітини не інактивуються в процесі;
- збереження дисперсної фази препарату;
- висушений продукт можна зберігати досить тривалий термін;
- відсутність впливу високих температур [64].

Недоліки:

- необхідність ретельної підготовки препарату до сушки;
- створення високого вакууму для повноти висихання;
- тривалість сушіння;

- досить високі енерговитрати [83].

Під час сублімаційної сушки, волога всередині матеріалу мігрує у вигляді пари. Сублімаційна вакуумна сушка продукту є одним з найсучасніших методів оборотної консервації мікроорганізмів і біопрепаратів, який забезпечує найкращу якість сухого продукту і високу відновлюваність лактобактерій при мінімальній тривалості процесу і, відповідно, мінімальних витратах [83].

Розрізняють три стадії сублімаційного сушіння:

- 1) заморожування продукту в камері при мінус 20°C та різкому зниженні тиску;
- 2) власне період сублімації, перехід льоду у газоподібний стан;
- 3) видалення пари за допомогою теплоти.

Чим швидше і глибше заморожується продукт, тим дрібніші кристали льоду утворюються в продукті. Дрібні кристали скоріше випаровуються при сушці, що підвищує якість і розчинність отриманого продукту. На кінетику сушіння має вплив температура, швидкість теплоносія, та товщина шару матеріалу [83].

Зважаючи на все вищенаписане, ліофілізацію будемо проводити після концентрування біомаси бактерій шляхом центрифугування протягом 40 хв при частоті $n = 6000$ об/хв. Далі біомасу в асептичних умовах змішуємо із захисним середовищем у співвідношенні 2:1 у реакторі змішувачі і заморожуємо при температурі мінус 20 °C [64].

Після повного заморожування біомасу слід висушувати при наступних умовах: $p = (0,01-0,03)$ атм., $T = - (50,3-51,2)$ °C, $\tau = 28$ год [78].

5.2.4. Подрібнення

Після сушіння біомаси бактерій, до якої попередньо було внесене захисне середовище, вона має вигляд суцільного твердого коржа, що містить 2—4% води. Тому необхідною технологічною операцією є подрібнення таких коржів з метою отримання тонкодисперсного стійкого порошку [84].

Подрібнювання — це руйнування матеріалу під дією зовнішніх сил, що переборюють сили зчеплення між частинками. Вибір способу залежить від фізико-механічних властивостей матеріалу і потрібного ступеня подрібнення. Для твердих матеріалів ефективні роздавлювання й удар, для крихких — розколювання; для вологих в'язких матеріалів — стирання в сполученні з роздавлюванням [85].

Для процесу подрібнення слід використовувати закриті обладнання або обладнання, що герметично закривається. Поверхні, що контактують з АФІ, не повинні впливати на якість продукту. Під час процесу подрібнення обладнання повинно забезпечувати розмір часток у межах передбачених документацією [65].

Обладнання для подрібнювання можна класифікувати за розміром отриманих часток, тобто за класом подрібнення, та за способом подрібнення. В залежності від класу подрібнення, подрібнювачі умовно поділяють на дробарки крупного, середнього, мілкового здрібнення та млини тонкого та надтонкого помелу [86].

Кінцевий продукт - це порошок, отже обираємо машини, які здійснюють тонкий помел:

- барабанні млини;
- вібраційні млини;
- дезінтегратори, дисмембратори;
- молоткові дробарки.

Відмінною особливістю барабанних ситових млинів є наявність циліндричного сита, яке пропускає частки необхідного розміру. Це дозволяє використовувати ситові млини без класифікуючих пристроїв. Головний недолік млинів даної конструкції – часте захаращення сит, особливо при подрібненні вологих матеріалів, а також швидке зношування сит та низька продуктивність [86].

Основні недоліки вібраційних млинів: швидке зношення мелючих тіл, низький строк служби підшипників, корпусу та опор, відносно низька продуктивність, підвищене шумовиділення [86].

Дезінтегратори і дисмембратори відносяться до подрібнювачів ударної дії. Значним недоліком дезінтеграторів та дисмембраторів є швидке зношення пальців барабанів, а їх заміна є трудомісткою операцією [86].

Молоткові дробарки подрібнюють матеріал за допомогою молотків, що обертаються і здійснюють додаткові удари матеріалу об ребристу поверхню стінок корпусу. Дія молотків на клітини є незначною, тому не порушує їх цілісність. Перевагою використання даної машини є те, що матеріал подрібнюється до дуже дрібного стану та можливість регулювання швидкості обертання, висока продуктивність та малі енергозатрати [87].

Після сушки продукт вивантажують в асептичних умовах у молоткову дробарку і розпушують до розміру часток 0,25-0,5 мм. Далі подрібнений порошок йде на етап просіювання.

5.2.5. Просіювання

Подрібнювання матеріалу завжди неоднорідне за розміром часток. Із цієї причини доводиться відокремлювати крупніші або дрібніші частки від основної маси. Цей процес має назву просіювання, грохочення або ситова класифікація. У результаті просіювання вихідний матеріал розділяється на дві фракції: просів (матеріал, що пройшов крізь сітку) і відсів (що затримався на ситі) [88].

Просіювання - механічна класифікація на ситах, яке полягає в проходженні через отвори робочої поверхні грохота часток, які менші певного розміру, а решта затримується на поверхні та видаляється з неї [86].

У хіміко-фармацевтичній практиці застосовують наступні конструкції сит:

- обертові;
- хитні;
- вібраційні.

Основною частиною грохота є його робоча поверхня, яка виконана у вигляді дротових сит (іноді шовкових) або решіт зі сталевих листів зі штампованими отворами, або ж решіток з паралельних стрижнів - колосників.

Барабанні або обертові сита мають невелику продуктивність, значно кришать матеріал і утворюють пил, сита швидко забиваються. Ці недоліки настільки істотні, що барабанні грохоти поступово витісняються вібраційними [86].

Хитні грохоти у порівнянні з барабанними мають більшу продуктивність та ефективність просіювання. Недоліками є їх незначне кришення матеріалу, невірноваженість конструкції та швидкий вихід з ладу опорних стійок [86].

Вібраційні сита. Вібраційні грохоти широко використовуються в промисловості. Грохоти даного типу мають наступні переваги:

- 1) при високій частоті коливань сита його отвори майже не забиваються матеріалом, тобто усувається недолік, який властивий грохотам інших типів;
- 2) більш висока продуктивність і точність просіювання, ніж для грохотів інших типів;
- 3) придатність для крупного та тонкого просіювання різноманітних матеріалів з розмірами від 250 до 0,1 мм;
- 4) компактність, легкість регулювання та зміни сит;
- 5) менша витрата енергії, ніж для грохотів інших типів [86].

Порівнявши усі можливі сита для просіювання біомаси лактобацил, найкращим вибором для нашого виробництва буде обрати вібраційне сито.

5.2.6. Маркування пакування та відвантаження

Завершальним етапом одержання готового пробіотичного препарату є його пакування. Для того, щоб зберегти якість готового продукту використовується первинна і вторинна упаковка. При виборі первинної упаковки необхідно пам'ятати, що вона буде безпосередньо контактувати з лікарським засобом.

Пробіотики випускають у таких лікарських формах як:

- у флаконах або ампулах;
- у желатинових капсулах;
- супозиторії ректальні та вагінальні;
- таблетки;
- у пакетиках саше [89].

Переважно у більшості з даних лікарських форм є свої суттєві недоліки. Випускання сухої біомаси у флаконах чи ампулах зумовлює деяку незручність використання. Пацієнту потрібно буде здійснити ряд операцій (відкоркування флакону чи розкол ампули, розведення з рідиною у певних пропорціях) для споживання препарату всередину. Це є дещо енергозатратним та вимагає додаткових зусиль. При упакуванні та транспортуванні скляна тара може пошкодитися, що призведе до зіпсування препарату.

Використання форми супозиторіїв має ряд переваг таких як відсутність шкідливої дії на ШКТ, відсутність специфічного запаху та смаку, можливість застосування при нудоті та блювоті. Але є ряд істотних переваг, які ми маємо врахувати під час вибору лікарської форми нашого пробіотика. Найголовніший недолік - це термолабільність (супозиторії потребують спеціальних умов зберігання і транспортування), для пацієнтів може бути незручно саме введення препарату в організм (деякі хворі упереджено ставляться до даного способу, що зумовлено їх культурними традиціями) [90].

Сухий порошок у пакетиках саше, так само як і у випадку з флаконами і ампулами вимагає деяких операцій підготовки. Але пакетик саше порівняно з скляними флаконами не може пошкодитися під час транспортування. Значним недоліком саше є їх неекологічність. Після використання препарату, використаний пакетик викидається у смітник, що у подальшому забруднює навколишнє середовище. Такі пакетики довго розкладаються у ґрунті.

Капсули (від лат. *capsula* — футляр або оболонка) — тверді лікарські засоби з твердою або м'якою оболонкою різної форми і місткості (визначення ДФУ). Це дозована лікарська форма, яка складається з діючих і допоміжних речовин, поміщених в оболонку, та містить одну дозу діючої речовини.

Перевагою використання пробіотичного засобу у формі капсул ніж пігулок є те, що процес таблетування є дороговартісним, багатоступеневим процесом. Переваги капсулювання:

- Активні речовини піддаються мінімальній обробці, зберігаючи вихідні властивості;
- Зазвичай містять мінімальну кількість допоміжних речовин.
- У желатинову капсулу можна вкласти будь-який склад. Вони підходять для упаковки порошків з великими фракціями.
- Капсули швидше засвоюються. Спресовані склади в таблетках перетравлюються і розщеплюються довго. Капсула розчиняється практично миттєво, порошок всмоктується в кров протягом декількох хвилин.
- Просте вживання. Їх легко ковтати, вони не мають запаху і смаку, на відміну від стандартних таблеток [91].

Біологічно активні добавки найкраще вживати у формі пігулок або капсул. Випускати «Фарманекс Про-Бі» будемо у картонній пачці, всередині якої пластиковий флакон з капсулами кількістю у 30 шт.

Розрізняють 2 типи капсул: тверді капсули з ковпачками, м'які, з одиночною оболонкою. Для нашого виробництва будемо використовувати тверді капсули, так як продукт має вигляд порошку [91].

Для отримання оболонки капсул використовують високомолекулярні плівкоутворюючі речовини, здатні утворювати еластичні плівки, що характеризуються певною механічною міцністю. До таких матеріалів належать: казеїн, зеїни, ефіри целюлози та ефіри, жири та воскоподібні речовини, а також деякі синтетичні полімери [92].

Отже, обираємо в якості оболонки капсули таку суміш речовин: гідроксипропілметилцелюлозу, воду, каррагінан, калію хлорид.

Наповнення корпусу капсул — найбільш відповідальна операція. Відтворення і точність дозування залежить від характеристики наповнювача, методу наповнення і типу машини, що наповняє [93].

Наповнення твердих желатинових капсул здійснюється в п'ять операцій: 1) орієнтування порожніх капсул; 2) роз'єднання (розкриття) порожніх капсул; 3) наповнення корпусу капсули; 4) з'єднання і закриття тіла і кришечки капсули; 5) викидання наповнених капсул [93].

Після наповнення капсул, настає завершальний етап виробництва-маркування, пакування та відвантаження. Отримані капсули у кількості 30 штук упаковують у скляний флакон. Переваги скляної пляшки перед пластиковою: скло є хімічно інертним, непористим, жорстким пакувальним матеріалом, що забезпечує майже 100% бар'єр для вологи та кисню, використання скла замість пластику є екологічно доцільним рішенням.

Далі скляний флакон з капсулами маркують етикеткою, пакують у картонну пачку разом з інструкцією. На пачці вказують назву, виробника, термін придатності, товарний знак, адресу, вміст діючої речовини, об'єм препарату в капсулі, штрих код.

Пачки з препаратом упаковують в гофрокороб, заклеюють пакувальною стрічкою і маркують етикеткою. Далі пакований препарат відвантажують в приміщення карантинного зберігання продукції. Упакована продукція зберігається в захищеному від світла місці до отримання дозволу ВЯК на реалізацію продукції.

5.3. Обґрунтування фармацевтичної складової проекту

5.3.1. Обґрунтування вибору «чистих» приміщень

Продукти на основі біомаси слід виробляти відповідно до правил належної виробничої практики (GMP). Основна вимога при виробництві є наявність ізольованих приміщень та відповідних технічних засобів. Щоб уникнути небезпеки перехресної контамінації потрібно передбачити організацію виробництва за принципом окремих циклів роботи і використання закритих систем [89].

Згідно Належної виробничої практики чисте приміщення- це зона, в якій контролюється навколишнє середовище на наявність часток і мікроорганізмів, що контамінують [65].

Варто пам'ятати, що навколишнє середовище приміщень має становити мінімальний ризик контамінації продукції, тому вибір правильного класу для одержання нашого пробіотичного препарату є визначальним фактором [65].

Визначити потрібний клас чистоти потрібно виходячи з технологічних циклів виробництва, які будуть проводитися в них. На нашому виробництві для одержання готового пробіотичного продукту наявні такі етапи як: допоміжні роботи, виробничий біосинтез, виділення готового продукту та стадії пакування, маркування та відвантаження.

При роботі з культурою у лабораторії та боксах повітря, яке подається, потрібно очищувати. Щоб отримати чисте повітря, використовуємо ультрафіолетові лампи, а для знезараження повітря при вирощуванні посівного матеріалу та виробничому біосинтезі – очищене на фільтрах повітря.

Варто пам'ятати, що під час виділення біомаси об'єми проміжних продуктів відносно малі, тому всі транспортні процеси робляться за допомогою людини та невеликих пересувних ємностей, що збільшує ризик контамінації.

Основними джерелами забруднення є: стіни, підлога, стеля, пил з кондиціонерів, людський фактор (мікро-частки шкіри та волосся, частки одягу, кашель і чхання), інструменти і предмети, від продукту, що виробляється.

Розрізняють чотири основні класи чистих приміщень:

1. Клас **A**. Кількість допустимих часток не більше 3 500, а життєздатних організмів - 1 на метр квадратний.
2. Клас **B**. Допустимі частки аналогічні класу A, а організмів - не більше 10.
3. Клас **C**. Рівень допустимих частинок - 350000, а життєздатних організмів - 100.
4. Клас **D**. Кількість частинок - 3500000, а організмів не більше 500 [89].

Нормативи максимального рівня вмісту часток та мікроорганізмів у повітрі повинні витримуватися в усьому виробничому приміщенні, коли воно знаходиться в оснащеному стані, а максимально допустима кількість

життєздатних мікроорганізмів — відповідати нормативним вимогам у повітрі робочої зони, коли приміщення знаходиться у функціонуючому стані [94].

Для підготовки інокуляту та виробничого біосинтезу обирають клас чистоти В (із зоною А). Максимально допустима кількість часточок в 1м³ повітря в оснащеному стані: 0,5 мкм – 3500, в експлуатаційному: 0,5 мкм – 350000; 5,0 мкм - 2000.

Для етапів виділення та пакування, маркування та відвантаження готового продукту клас чистоти має бути нижчий ніж для виробничого біосинтезу.

Класи чистоти А і В використовуються для виробництва стерильних лікарських засобів, яким наш засіб не являється. Обирати такі класи чистоти для відділення, недоцільно для нестерильних лікарських засобів, тому що забезпечити високу чистоту є економічно не вигідно для виробництва.

Натомість, проводити операції виділення та пакування у класі чистоти D буде також неправильним рішенням, так як кінцевий продукт це біомаса ліофільно висушених бактерій, яку не можна піддавати високому ризику контамінації.

У класі чистоти С можливе приготування розчинів, в тому випадку, коли ризик контамінації майже виключений, а також дозволяється фасувати продукцію. Для стадій виділення і одержання нашого пробіотика цей клас чистоти є найбільш оптимальним.

5.3.2. Обґрунтування підготовки вентиляційного повітря

Системи підготовки вентиляційного повітря слід проектувати, виходячи зі спеціальних вимог до технологічних операцій, вимог до приміщень виробництва лікарських засобів, що описані у належній виробничій практиці СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016.

Для підтримання необхідних параметрів повітряного середовища як в жилих, так і у виробничих приміщеннях існують різні системи вентиляції, що диференціюють: за способом надходження повітря (природна й штучна), місцем дії (місцева і загальна), призначенням (припливна, витяжна,

припливно-витяжна). Виробничі приміщення фармацевтичних та медичних підприємств обладнують системами турбулентної і ламінарної вентиляції [95].

Продукти на основі біомаси слід виробляти відповідно до правил належної виробничої практики (GMP). Основна вимога, яка прописується у СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016, що при виробництві має бути наявність ізольованих приміщень та відповідних технічних засобів. Щоб уникнути небезпеки перехресної контамінації потрібно передбачити організацію виробництва за принципом окремих циклів роботи і використання закритих систем [27].

При виробництві лікарських засобів, що містять в собі клітини мікроорганізмів використовують системи ламінарної вентиляції, що забезпечують спрямовані до робочої зони приміщення потоки стерильного повітря (які попередньо проходять через фільтри різного ступеня очищення) і витискують всі механічні і мікробні контаміанти, що знаходяться в повітрі приміщення. Приміщення з ламінарним потоком — приміщення, у яких повітря подається в напрямку до робочої зони через фільтри, що займають всю стіну або стелю, і видаляється через поверхню, протилежну входів повітря. Повітряний потік такого типу здатний відразу видалити аерозольні забруднення, джерелами яких є персонал і процеси виробництва, тоді як система з турбулентної вентиляцією заснована на змішуванні і розведенні самих забруднень [95].

Перевагою ламінарного потоку є те, що він виносить із кімнати всі завислі в повітрі частинки, що надходять із будь яких джерел (персонал, устаткування та ін.).

У настанові зазначається, що очищення припливного повітря, яке подається в приміщення класу чистоти С має бути тріступінчастим [96].

На першому ступені очистки повітря використовують осередкові фільтри попереднього очищення, які очищають (звільняють) повітря від механічних частинок. Їх встановлюють на вході в кондиціонер або в припливну камеру. У даному проекті запропонуємо використання фільтра повітряного карманного (ФПК), який забезпечує клас очищення G3 та G4 [97].

Фільтри, що використовуються при другому ступені очистки встановлюються безпосередньо перед повітродозподільчим пристроєм та призначені для тонкої фільтрації повітря від бактерій і твердих домішок при концентрації пилу $0,5 \text{ мг/м}^3$. В ролі фільтра тонкого очищення буде виступати карманний фільтр ФВК F7 [95,98].

Для зони типу С система постачання повітрям повинна мати відповідні фільтри, такі як HEPA – фільтри, що встановлюються безпосередньо в місці подачі повітря в робочу зону.

HEPA-фільтр являє собою високоефективний фільтр нового покоління, призначений для видалення з повітря дрібнодисперсних шкідливих частинок, а також PM2.5 і PM10 (з діаметром менше 2,5 і 10 мкм відповідно). HEPA – це клас, який має свої параметри і має певний ГОСТ EN 1822-1:2009 і ГОСТ Р EN 1822-1-2010 [99].

Отже, для першого та другого ступеня очистки повітря використовують фільтр, який забезпечує клас очищення G3/G4 та F7. Для третього ступеня очищення фільтр HEPA - від H14 до H10.

5.3.3. Обґрунтування водопідготовки

Вода це речовина, яка широко використовується під час виробництва з різною метою: як допоміжна речовина в складі лікарських засобів, як розчинник для підготовки препаратів до застосування, як розчинник при синтезі активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) і виробництві лікарських засобів, як очищувальний засіб для промивки й очищення обладнання, первинних пакувальних матеріалів тощо. Вимоги до якості води залежать від її призначення і встановлені у фармакопейних монографіях [100].

Виробництво та контроль якості води, що використовують при виробництві лікарських засобів, входять до сфери дії належної виробничої практики (GMP). Слід також зазначити, що сфера застосування води залежить не тільки від її якості, але й від способу виготовлення [101,102].

Для одержання готового пробіотичного препарату на виробництві доцільним є використання води водопровідної (питної) (для подачі у рубашку

ферментера, приготування миючих та деззаобів та для приготування поживних середовищ), води очищеної (для ополіскування обладнання після миття, приготування захисного середовища) та дистильованої води для приготування титрувальних агентів у лабораторії.

Згідно GMP установки для підготовки води і системи її розподілу слід проектувати, конструювати й експлуатувати так, щоб забезпечити надійне постачання води відповідної якості [100].

Вода очищена-це вода, при виробництві до якої не висувають вимоги щодо стерильності чи апірогенності. Воду очищену одержують із води питної дистиляцією, іонним обміном, зворотним осмосом або будь-яким іншим підходящим способом. Для води очищеної при зберіганні та у мережі дистрибуції мають бути створені умови, що запобігають росту мікроорганізмів і дозволяють уникнути будь-якого іншого забруднення [100].

Схема підготовки води очищеної включає в себе фільтрування через вугільний фільтр (адсорбція органічних матеріалів з низькою молекулярною вагою), іонний обмін (видалення з води катіонів і аніонів), зворотній осмос (перехід води із розчину через напівпроникну мембрану під дією зовнішнього тиску). Оскільки дана схема підготовки води є стандартною, наведення її в технологічній та апаратурній схемі не передбачається.

5.3.4. Обґрунтування миючих та дезінфікуючих засобів

Згідно GMP санітарна обробка чистих зон має особливо важливе значення. Зони необхідно старанно очищати згідно з письмовою програмою. У разі проведення дезінфекції слід застосовувати декілька типів дезінфікуючих засобів. Для виявлення розвитку стійких штамів потрібно здійснювати регулярний контроль. Миючі і дезінфікуючі засоби необхідно контролювати щодо мікробіологічної чистоти. Їх розчини слід тримати в попередньо очищених контейнерах (тарі) й зберігати лише протягом установлених термінів (за винятком тих розчинів, що стерилізують). Миючі та дезінфікуючі засоби, що використовуються в зонах класів А і В, перед використанням мають бути стерильні. Для зниження мікробіологічної

контамінації в недоступних місцях може бути корисна фумігація чистих зон [65].

При виробництві препаратів на основі біомаси обладнання та приміщення щодня забруднюються органічними речовинами. Органічні речовини - ідеальне середовище для розвитку хвороботворних бактерій [103]. Очищення, мийка і дезінфекція обладнання та приміщень - це складна багатоступенева процедура. Щоб забезпечити ідеальні санітарні умови, важливо підібрати ефективні методи і засоби дезінфекції, враховуючи характер і ступінь забруднення, тип обладнання, умови виробничого процесу [103].

В якості миючих засобів для очищення обладнання, устаткування, поверхонь, комунікацій, стін, дверей та підлоги фармацевтичного виробництва слід обрати Біомой періодично замінюючи його на Хлорантоїн Використання робочих розчинів Біомою з огляду на відсутність в його складі летючих компонентів, не представляє загрози надходження компонентів в повітря робочої зони. Засіб слід використовувати при ручному чи механізованому способі очищення [104].

Робочі розчини Хлорантоїну мають миючі, дезінфікуючі та передстерилізаційні властивості. Щодо дезінфікуючої активності то Хлорантоїн перевищує в 5-10 разів звичайні дезінфікуючі засоби та виключає застосування лужних миючих засобів. Використання Хлорантоїну дозволяє поєднати в одній операції стадії миття, дезінфекції та передстерилізації, скоротити тривалість санітарної обробки [105].

Для дезінфекції обладнання у реєстрі лікарських засобів рекомендують використовувати Вітоксид Нітро, Дезамін та Антихлор. Порівнявши ці 3 деззасоби для обладнання, можна дійти до висновку, що найкраще застосовувати Вітоксид Нітро. Так як Дезамін в своєму складі містить ЧАС, що мають недостатню активність до деяких мікроорганізмів і при тривалому використанні викликають резистентність. Натомість Вітоксид Нітро має в своєму складі перекис водню, який екологічно безпечний. Але візьмемо до

уваги, що засіб потрібно змінювати 1 раз на три місяці задля запобігання звикання патогенних мікроорганізмів, тому на заміну оберемо Антихлор [106].

Для дезінфекції устаткування використовують такі засоби як СДамін та PROFİ CHLOR. Порівнявши ці два засоби для дезінфекції устаткування обираємо 2%ий розчин СДамін, так як він має миючо-дезінфікуючі властивості, що значно зменшить витрати на закупівлю розчинів для дезінфекції та миття окремо, та порівняно з PROFİ CHLOR значно безпечний при використанні [106].

Щоб проводити дезінфекцію поверхонь, вікон, дверей, підлоги і стін на фармацевтичному виробництві, у реєстрі дезінфікуючих засобів за 2020 рік пропонується обрати такі засоби як Oxivir Plus та Sviteco-PIP Interior Cleaner [106].

Так як Sviteco-PIP Interior Cleaner в своєму складі містить ЧАС, його не варто застосовувати. Обґрунтуємо це тим, що ці сполуки недостатньо активні щодо грамнегативних бактерій, збудників туберкульозу, пікновірусів, псевдомонад і мукоїдних штамів стафілококів. Мікроорганізми швидко звикають до ЧАС та з часом стають резистентними до його дії.

Тому доцільно використовувати для дезінфекції поверхонь, вікон, дверей, підлоги і стін мийно-дезінфікуючий засіб Oxivir Plus.

При проектуванні виробництва важливо пам'ятати про те, що контамінація може бути створена працівниками через недотримання правил гігієни. Тому для обробки рук персоналу порівняємо такі деззасоби як «Alsoft V», діючою речовиною якого є спирт етиловий у межах 76,9 - 81,4%, «СТОПінфекція-100» (етанол, 66%; 2-аміно-2-метил-1 пропанол, 0,16%), «Септаль» (д.р.: ізопропіловий спирт 58-62%, полігексаметиленгуанідіну гідрохлорид – 0,4- 0,6%). У всіх представлених засобів в складі наявні спирти і кожен є ефективний по відношенню до мікроорганізмів. Обираємо засіб «Alsoft V», а для запобігання резистентності мікроорганізмів до цього засобу, на заміну йому використовуємо «Септаль» (склад відрізняється вмістом:

замість етанолу, ізопропіловий спирт, що буде спричиняти позитивний ефект щодо знезараження) [106].

Тому доцільно використовувати для дезінфекції поверхонь, вікон, дверей, підлоги і стін мийно-дезінфікуючий засіб Oxivir Plus.

5.4. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

1. Обґрунтовано вибір таких післяферментаційних стадій:

ТП 8. Зберігання культуральної рідини

ТП 9. Відділення біомаси

ТП 9.1 Центрифугування культуральної рідини

ТП 10. Отримання напівфабрикату

ТП 10.1 Змішування з захисним середовищем

ТП 12. Сублімаційне сушіння

ТП 12.1 Ліофілізація

ТП 13. Подрібнення

ТП 13.1 Подрібнення молотковою дробаркою

ТП 14. Просіювання

ТП 14.1 Просіювання на вібраційному ситі

ПМВ 15. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 15.1. Наповнення капсул

ПМВ 15.2. Упаковка капсул у флакони

ПМВ 15.3. Пакування флаконів у пачки та їх маркування

ПМВ 15.4. Складання пачок з флаконами у гофрокороб і відвантаження

2. Вихідні дані:

- a. об'єм культуральної рідини з однієї ферментації - $V_{кр} = 0,152 \text{ м}^3$;
- b. концентрація біомаси у КР $C_{БМ} = 7 \text{ г/л} (=7 \text{ кг/м}^3)$ – АСБ.
- c. втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 20% початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає $0,152 \text{ м}^3 \times 7 \text{ кг/м}^3 = 1,064 \text{ кг}$; кінцева кількість (з урахуванням 20% втрат) та 30% захисного середовища має становити 1,11 кг

3. Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у таблиці 5.1.

Таблиця 5.1

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 20 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 8. Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 8. Зберігання культуральної рідини	КР	0,152 м ³ (152 л)	-	0,152 м ³ (152 л)	Збірник об'ємом 160 л з перемішувачем
ТП 9. Відділення біомаси						
2	ТП 9.1 Центрифугування культуральної рідини	Біомаса	1,064 кг (0,152×7)- АСБ, з урахуванням 90% вологості 10,64 кг	0,4 кг (5%)	11 кг	Центрифуга з частотою обертів - 6000 об/хв, 40 хв
		Фугат	141 л (152-11)	-	141 л	На утилізацію
ТП 10. Отримання напівфабрикату						
3	ТП 10.1 Змішування з захисним середовищем	Біомаса	11 кг	-	-	Збірник на 20 л з перемішувачем

Продовження табл. 5.1

		Захисне середовище	30% від біомаси (3,3 кг)	-	14,3	
ТП 11. Сублімаційне сушіння						
4	ТП 11.1. Ліофілізація	Біомаса з захисним середовищем (вологість 90 %)	14,3 кг (у перерахунку на АСР – 1,43 кг, з урахуванням 6% вологи – 1,52 кг)	-	-	Ліофільна сушарка Кількість полицок: 3 + 1 платина теплової рівноваги; Розмір полицок: 560 мм x 300 мм x 16 мм; Корисна площа полицок: 0,5 м ² ;
		Висушена біомаса (вологість 6%)	-	0,08 кг (5%)	1,44 кг (1,52-0,08)	-
ТП 12. Подрібнення						
5	ТП 12.1 Подрібнення молотковою дробаркою	Суха біомаса	1,44 кг	-	-	Молоткова дробарка Продуктивність: 30-50 кг/год; Кількість сит, розмір сит: 4 шт; Кількість обертів: 2800 об/хв;
		Подрібнена біомаса	-	0,043 кг (3%)	1,39 кг (1,44-0,043)	-

Продовження табл. 5.1

ТП 13. Просіювання						
6	ТП 13.1 Просіювання на вібраційному ситі	Подрібнена біомаса	1,39	-	-	Вібраційне сито Діаметр сита: 400 мм; Ефективна площа просіювання: 0,0907 м ² ;
		Просіяна біомаса	-	0,042 (3%)	1,34 (1,39-0,042)	-
ПМВ 14. Пакування, маркування, відвантаження						
7	ПМВ 14.1. Наповнення капсул	Просіяна біомаса	1,34 кг	-	-	Автоматична машина для наповнення твердих желатинових капсул Продуктивність: 12000 капсул / год;
		Упакований у капсули (по 344 мг) цільовий продукт	-	0,02 (2%)	1,32 кг = 1320000 мг = 14667 капсул	
	ПМВ 14.2. Упаковка капсул у флакони	Капсули	14667 шт	-	-	Фармацевтичний лічильник капсул та наповнювач флаконів. Тара об'ємом 15-500 мл. Продуктивність: 100-700 шт/хв. Габаритні розміри: 500x430x630 мм.
Упаковані капсули у флакони (30 капсул в 1 флаконі)		-	146 шт (1%)	14521 капсул/30 капсул в флаконі=484 флаконів		

Закінчення табл. 5.1

	ПМВ 14.3. Пакування флаконів у пачки та їх маркування	Флакони з капсулами	484 флакони	-	-	Автоматична картонажна машина для упаковки флаконів у коробки. Продуктивність: до 70 шт/хв. Габарити: 3100x1140x1800.
		Упаковані флакони у пачки (1 флакон у 1 пачку)	-	(0,5%)	481 флаконів/1=481 пачок	
	ПМВ 14.4. Складання пачок з флаконами у гофрокороб і відвантаження	Пачки з флаконами	481 пачок	-	-	Працівники вручну складають продукт у гофрокороба
		Гофрокороб по 10 пачок в коробці	-	(0,5%)	478/10=48 гофрокоробів	

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт, виробничого біосинтезу, стадій виділення та пакування маркування біомаси *Lactobacillus fermentum* F6

Таблиця 6.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	2	Повітрязабірник Aiger deltafan maxі Продуктивність 1100 – 1800 м ³ /год Перепад тиску 25 – 40 Па [107].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Марка ФПК-66-600-6-G4/25 виробника «Воздушные фильтры» Росія. Фільтруючий матеріал- поліестер. Продуктивність фільтра-3400 м ³ /год [97].
Ф-3	Фільтр тонкої очистки повітря	1	ФВК F7 виробника «LuxFilter», Росія. оцинкованого П-подібного профілю. Фільтруючий матеріал-мелтблоун товщиною 8 мм. Пиломісткість-290 г/м ² . Продуктивність – 3500 м ³ /год [98].
В-4	Вентилятор	1	Вентилятор центробіжний «Вентс ВЦУН 225x103 -2,2-2 ПР». Корпус сталевий, покритий полімером. Двигуни асинхронні, захищені від пилу і крапель води. Енергоспоживання 250 Вт. Витрата повітря: 3350 м ³ /год, Діаметр патрубка: 151 \\. Рівень шуму: 75 Дба. Температура повітря: до +60°С. Швидкість обертів: 2865 об/хв. Габаритні розміри:432x507x388 мм [108].

НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Максимець О.О		
Перевір.		Грегірчак Н.М.		
Консультант				
Н.Контр.				
Затверд.		Пирог Т.П.		
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання			Літ.	Арк.
				73
			Акрушів 14275	
			Кафедра БТМ	

Продовження табл. 6.1

T-5, T-6	Теплообмінник-охолоджувач	2	Теплообмінник WHE 2040. Максимальний тиск 25 бар. Потужність 29 кВт, пропускна здібність 140 л/хв, охолоджувальна здібність 29 кВт/год. Виробник: «Paskal» Італія [109].
T-7, T-8	Теплообмінник-нагрівач	2	Теплообмінник-нагрівач серії КС 1750 фірми «Галактика» (Україна), кількість повітря 4500 м ³ /год, тепла потужність 45 кВт [110].
Ф-9	Індивідуальний фільтр	1	Виробник «Технофільтр», Україна, клас очищення EN 779 від H14 до H10. Фільтроматеріал – мікроскловолокно. Рамка - МДФ, алюмінієвий, оцинкований, нержавіючий профіль. Клас фільтрації від H10 до U16. Матеріал: гофрований фільтрувальний папір на основі ультра- і мікротонкого скловолокна. Скляні волокна діаметром 0,25- 1,0 мкм, Ефективність: до 99,9995% [111].
Ф-10	Фільтр грубої очистки	1	Тип: SFB 40-20. Клас матеріалу G4. Тип каналу: для прямокутних каналів. Рамка: оцинкована сталь. Типорозмір 40-20 мм. Кількість карманів: Габаритні розміри: 440x240 мм. Маса 5 кг. Виробник: Ventbazar, Україна [112].
К-11	Компресор	1	Компресор GA 7 FF фірми Atlas Copco (Бельгія-Швеція), потужність 1,26 м ³ /хв, робочий тиск 0,75 МПа [113].
Р-12	Ресивер	1	Ресивер серії Р 200.500 фірми «КС» (Україна), об'єм 200 л., робочий тиск 1МПа [114].
Ф-13	Фільтр тонкої очистки	1	Тип: ФБК 700x400-7. Клас матеріалу: синтетичне волокно F7. Рамка: оцинкована сталь. Типорозмір 70-40 мм. Габаритні розміри: 720x440x740 мм. Маса 16,2 кг. Виробник: Ventbazar, Україна [115].

Продовження табл. 6.1

Ф-14,Ф-15	Фільтр індивідуальний НЕРА	2	<p>Модель: В56-В04. Габарити: 484x484x220 мм. Продуктивність: 1000 м³/год.</p> <p>Медіальний матеріал: Скловолокно</p> <p>Матеріал рами: алюміній /нержавіюча сталь / МДФ / оцинкована сталь. Матеріал прокладки: EVA / неопрен</p> <p>Додаткова товщина алюмінію (мм): 80/96/120/150/220/292</p> <p>Максимальна робоча температура: 80 °С</p> <p>Максимальна робоча вологість: 80%</p> <p>Виробник: Vasclean, Китай [116].</p>
РЗ-16	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції Б	1	<p>Реактор-змішувач виробника «BIOSTAT Cplus 20 л» (Росія). Загальний об'єм 20 л. Нержавіюча сталь. Обладнаний мішалкою 20-1000 об/хв, рубашкою, Робочий тиск від 0,05 до 0,2 МПа.</p> <p>Потужність двигуна 1200 Вт.</p> <p>Габаритні розміри* (ДхВ), мм: 335x440 [117, 118].</p>
ФР-17	Посівний апарат (ферментер)	1	<p>Ферментер серії BIORUS-SJA виробника «BIORUS» (Білорусь). Загальний об'єм 25 л. Нержавіюча сталь марки AISI 316 L та AISI 304. Коефіцієнт заповнення 70%.</p> <p>Робочий тиск апарату 0,3 МПа. Робочий тиск рубашки 0,3 МПа.</p> <p>Оснащений мішалкою 20-1000 об/хв, датчиками температури, рН. Автоматична подача лугу.</p> <p>Габаритні розміри* (ДхВ), мм: 450x505 [119,120].</p>
РЗ-18	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	<p>Реактор-змішувач виробника «BIOSTAT Cplus 20 л» (Росія). Загальний об'єм 20 л. Нержавіюча сталь. Обладнаний мішалкою 20-1000 об/хв, рубашкою, Робочий тиск від 0,05 до 0,2 МПа.</p> <p>Потужність двигуна 1200 Вт.</p> <p>Габаритні розміри* (ДхВ), мм: 335x440 [117, 118].</p>

Продовження табл. 6.1

Д-19,Д-20	Дозатор-ваговий	2	Дозатор-ваговий для сипучих компонентів фірми «Гігант» (Україна). Габарити (ШхГхВ), мм:1000х1000х2400. Продуктивність 5-20 доз/хв. Діапазон від 100 г до 10 кг [121].
РЗ-21	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції Б	1	Реактор-змішувач фірми «СНЕМАР АГ» (Швейцарія). Загальний об'єм 150 л. Робочий тиск до 0,3 МПа. Оснащений рубашкою, та триступеневою турбінною мішалкою 600-3000 об/хв. Габаритні розміри*(ДхШхВ), мм: 845х838х1350 [122, 123].
3-22	Збірник для приготування композиції В	1	Збірник виробника «МашХім» (Росія). Загальний об'єм 40 л. Оснащений мішалкою 25-3000 об/хв. Потужність приводу 0,75-1,5 кВт. Габаритні розміри (ДхВ), мм: 566х1105 [124].
Н-23, Н-24, Н-25, Н-26	Насос перистальтичний	4	Насос перистальтичний ВЗ-V 12-1 90-260V. Тиск - 1 бар, Продуктивність-12 л/год. Матеріал- santoprene. Габарити: 90х137х109 мм [125].
Н-27	Насос-відцентровий	1	Насос відцентровий JEX 750 "Насоси+" (Україна). Продуктивність 0,6 м ³ /год, 10 л/хв. Потужність 0,75 кВт [126].
ФР-28	Ферментер	1	Ферментер виробника «BAILUN BIO» моделі BLBIO-XSJA (Китай). Загальний об'єм 250 л. Нержавіюча сталь 316L. Тиск всередині 0,3МПа. Автоматична стерилізація (SIP). Оснащений рубашкою, мішалкою, датчиком рН, манометром, термометром. Має програмне забезпечення. Габаритні розміри* (ДхВ), мм: 1020х2035 [124,127].

Продовження табл. 6.1

З-29	Збірник для культуральної рідини з біомасою	1	Збірник об'ємом 160 л. Рубашка обігріву чи холодження, робочий тиск – 0,6 Мпа, якірна мішалка, діапазон температур від – 25°C до 200 °С. Габаритні розміри: 812x1500 [128].
Ц-30	Центрифуга	1	Центрифуга ОГШ-202К-03: Максимальна чистота обертів: 6000 об/хв; Фактор розділення: 4000 Відношення робочої довжини ротора до внутрішнього діаметра: 3,1; Потужність електронного двигуна приводу: 5,5 кВт; Габаритні розміри: 1490x860x590 мм; Маса: 490 кг [129].
РЗ-31	Реактор-змішувач	1	Об'єм 20 л. Виробник: Азовхімсервіс. Потужність двигуна: 370 Вт. Частота обертів лопатевої мішалки: 0-680 об/хв. Робоча температура: -120°C - 300°C. Наявні конденсатор з змійовиком [130].
С-32	Ліофільна сушарка	1	Вакуумна ліофільна сублімаційна сушарка «RL-05»: Виробник: Tiangey, Китай Матеріал: європейська нержавіюча сталь AISI 316L; Кількість полицок: 3 + 1 платина теплової рівноваги; Розмір полицок: 560 мм x 300 мм x 16 мм; Корисна площа полицок: 0,5 м ² ; Відстань між полицками: 100 мм; Температурний діапазон: від -70 до +80 °С; Швидкість охолодження: від +20 до -40 °С, 30 хв; Швидкість нагріву полицок: від +20 до -40 °С, 60 хв; Габаритні розміри: 1500 мм x 950 мм x 1800 мм; Швидкість охолодження конденсатора: від +20 до -40 °С, 30 хв [131].

Закінчення табл. 6.1

Д-33	Молоткова дробарка	1	Молоткова дробарка YF8-1: Виробник: Китай Продуктивність: 30-50 кг / год; Кількість сит, розмір сит: 4 шт: 6мм, 250, 177, 149, 105 мікрон; Кількість обертів: 2800 об/хв; Напруга: 220 Вольт; Потужність: 3 кВтт; Вага: 65 кг; Розміри: 580х360х480 мм; Водяне охолодження відсутнє [132].
BC-34	Вібраційне сито	1	Промислове вібраційне сито VS-04: Виробник: MiniPress, Росія; Діаметр сита: 400 мм; Ефективна площа просіювання: 0,0907 м ² ; Розмір часток: 2-400 мкм; Кількість рівнів: 2; Амплітуда коливань: 0,4; Мотор: 1460 об/хв; Габаритні розміри: 750х600х800 мм [133].
AB-35	Автомат для наповнення капсул	1	Машина для наповнення капсул ZANASI 12. Продуктивність 12000 капсул/год. Розмір капсули 000-5, supro А-Е, DB, DBAA. Максимальна потужність 10 кВт. Вага 1,000 кг.[134].
AB-36	Автомат для підрахунку та наповнення флаконів капсулами	1	Фармацевтичний лічильник капсул та наповнювач флаконів CDR-5A. Виробник «Чумаки в Китаї», Китай. Максимальний діаметр капсули 23 мм, тара об'ємом 15-500 мл. Продуктивність: 100-700 шт/хв. Потужність: 350 Ватт. Габаритні розміри: 500х430х630 мм [135].
AB-37	Автомат для упаковки флаконів у коробки	1	Автоматична картонажна машина для упаковки флаконів у коробки АКМ-6000.Виробник:AURORA, Росія. Продуктивність: до 70 шт/хв. Габарити: 3100х1140х1800. Напруга: 380 В. Робочий тиск: 0,6 МПа [136].

Примітка.*- розміри взято для апарату аналогічного об'єму.

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу та виділення біомаси включає допоміжні роботи (підготовка вентиляційного та аераційного повітря, санітарна підготовка виробництва (мийних та дезінфікуючих засобів), підготовка виробничих приміщень, обладнання, персоналу, підготовка і стерилізація допоміжних розчинів, поживних середовищ та захисного середовища), технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез біомаси *Lactobacillus fermentum* F6, зберігання культуральної рідини, центрифугування, змішування з захисним середовищем, ліофілізація, подрібнення та просіювання), етап пакування маркування та відвантаження готового продукту та стадії знешкодження рідких, твердих та газоподібних відходів.

Технологічну схему біосинтезу наведено у графічній частині проєкту.

ДР 1. Підготовка повітря

ДР 1.1 Підготовка вентиляційного повітря

ДР 1.1.1 Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря відбувається на рівні 3 м, за допомогою повітрозабірника (ПЗ -1).

ДР 1.1.2 Грубе очищення повітря

Для видалення великих часток пилу, які присутні у зібраному атмосферному повітрі, використовуємо фільтр повітряний карманний ФПК-66-600-6-G4/25, клас очищення G3 та G4 (Ф-2). В якості фільтруючого матеріалу слугує поліестер, а матеріал корпусу- нержавіюча оцинкована сталь. E=80%.

					НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	Лім.	Арк.	Акруїів
Розроб.		Максимець О.О.					79	142
Перевір.		Грегірчак Н.М.						
Консультант								
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ ⁸¹		

ДР 1.1.3 Тонке очищення повітря

Використовуємо фільтр карманний ФВК F7 (Ф-3). Його конструкція виконана з оцинкованого профілю і кишень які виконані з фільтруючого матеріалу- мелтблоун. Висока пиломісткість- 290 г/м². Ступінь очищення E = 95%.

ДР 1.1.4 Стабілізація термодинамічних показників

За допомогою вентилятора (В-4), повітря направляється до кожухотрубного теплообмінника, в якому охолоджується (Т-5) або нагрівається (Т-7) (в залежності від пори року). На виході вологість має становити 30-60%.

ДР 1.1.5. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Щоб отримати повітря максимально очищене для цього необхідно пропустити його через фільтр НЕРА EN 779 з класом очищення від Н14 до Н10 (Ф-9). Фільтрматеріал- мікроскловолокно, обрамлене нержавіючою оцинкованою рамкою. E =99,995%.

ДР 1.2 Підготовка аераційного повітря

ДР 1.2.1 Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря відбувається на рівні 3 м, за допомогою повітрозабірника (ПЗ -1).

ДР 1.2.2 Грубе очищення повітря

Стадія попереднього очищення повітря передбачає видалення з повітря великих часток пилу. В якості фільтрів для грубого очищення використовуємо фільтр повітряний касетний Aerostar SFB 40-20 з 3 карманами (Ф-10). Діапазон робочих температур від -40°C до +70 °C. Корпус фільтра зроблений з оцинкованої листової сталі. Змінні фільтруючі вставки мають фільтрувальні матеріали класу G4 розміром 40-20 мм, E=80%.

ДР 1.2.3 Стиснення повітря

Здійснюється в компресорі GA 7 FF фірми Atlas Copco (К-11), потужністю 1,26 м³/хв, за тиску 0,9 МПа, що призводить до підвищення

температури повітря до 200 °С і збільшення вмісту вологи на одиницю об'єму.

ДР 1.2.4 Охолодження повітря

Здійснюється в теплообміннику-охолоджувачі серії WHE 2040 (Т-6). продуктивністю 140 л/хв, задля випадання вологи (50-70%) в краплеуловлювачі. В теплообміннику повітря «переохолоджують» до температури 25 – 40 °С.

ДР 1.2.5 Видалення вологи

Для видалення конденсованої вологи ($W = 60-70\%$) використовуємо ресивер (Р-12). Дана установка зменшує пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря.

ДР 1.2.6 Нагрівання повітря

Здійснюють дану операцію задля справної роботи головного і індивідуального фільтрів. Повітря нагрівають в теплообміннику-нагрівачі серії КС 1750 (Т-8) до $t = 45-50^{\circ}\text{C}$, $W = 50\%$.

ДР 1.2.7 Очищення повітря в головному фільтрі

Наступний етап - очищення повітря у головному фільтрі ФБК 700x400-7 (Ф-13). Клас матеріалу: синтетичне волокно F7. Рамка виготовлена з оцинкованої сталі. Фільтруючий матеріал має товщину у 70-40 мм. Ступінь очищення становить $E = 95\%$.

ДР 1.2.8 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Використовуємо фільтр HEPA В56-В04 з класом очищення від Н14 (Ф-14, Ф-15). В ролі фільтрувального матеріалу використовується скловолокно, яке обрамлене алюмінієвою, нержавіючою, оцинкованою сталлю. Максимальна робоча температура: 80 °С. $E = 99,995\%$ (До ДР 2.3.4, ТП 6.5 та ТП 7.1).

ДР 2. Санітарна підготовка виробництва

ДР 2.1 Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів

Всі розчини, що використовуються як миючі та дезінфікуючі, слід зберігати у спеціальному добре провітрюваному приміщенні, без доступу

прямого сонячного світла. Тари, в яких зберігаються розчини, повинні бути щільно закриті. Пусті тари направляються на знешкодження (ЗВ 15.2).

ДР 2.1.1 Підготовка 0,3% розчину «Біомой»

Біомой концентрацією 0,3% готуємо розведенням 30 г засобу з 9,970 л теплої питної води. Далі Біомой використовують для миття обладнання та робочих поверхонь при щоденному прибиранні. До ДР 2.2.1, ДР 2.3.1

ДР 2.1.2 Підготовка 0,5% розчину «Біомой»

Біомой концентрацією 0,5% готуємо розведенням 50 г засобу з 9,950 л теплої питної води. Приготований розчин слід зберігати в промаркованій тарі з будь-якого матеріалу. Далі Біомой використовують для миття обладнання та робочих поверхонь при генеральному прибиранні. Термін зберігання розчину не більше 14 днів. До ДР 2.2.2.

ДР 2.1.3 Підготовка розчину 0,2% «Хлорантоїн»

Для отримання 0,2% розчину Хлорантоїну, розводимо 20 г речовини з 9,98 л теплої питної води. Розведення проводимо у тарі з будь-якого матеріалу, крім оцинкованого заліза. Перемішуємо 1-2 хв. До ДР 2.2.1, ДР 2.3.1.

ДР 2.1.4 Підготовка розчину 0,3% «Хлорантоїн»

Для отримання 0,3% розчину Хлорантоїну, розводимо 30 г речовини з 9,97 л теплої питної води. Розведення проводимо у тарі з будь-якого матеріалу, крім оцинкованого заліза. Перемішуємо 1-2 хв. До ДР 2.2.2.

ДР 2.1.5 Підготовка розчину СДамін

Даний засіб концентрацією 2% готуємо так: розчин розводимо 1:10, тобто 1 л розчину на 10 л теплої питної води. Даним засобом дезінфікуємо устаткування, обладнання та поверхні. Періодично змінюємо його на PROFİ CHLOR, який готується відповідно. До ДР 2.2.1, ДР 2.2.2.

ДР 2.1.6 Підготовка розчину Oxivir Plus

Концентрація розчину Oxivir Plus- 3,5%. Розводимо 35 мл розчину з 1 л теплої питної води. Використовуємо засіб для дезінфекції поверхонь, вікон, дерев, підлоги та стін. До ДР 2.2.1, ДР 2.2.2.

ДР 2.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 2.2.1. Щоденне прибирання

Підготовка приміщень класу чистоти В (з зоною А) та С включає комплекс заходів, що складається з вологого прибирання приміщень, дезінфекції поверхонь приміщень та обладнання, щоб досягнути даного класу чистоти.

При щоденному прибиранні приміщень застосовують 0,3% Біомой, який чергують з препаратом 0,2% Хлорантоїн через місяць від ДР 2.1.1, ДР 2.1.3.

Поточне вологе прибирання приміщень здійснюють щодня після проведення технологічного процесу.

Після обробки поверхонь розчином з миючими засобами всі поверхні миють гарячою водопровідною водою і висушують або ретельно витирають до відсутності вологи, а потім проводять дезобробку засобами Вітоксид Нітро, який на виробництво доставляється у готовій формі та 2% СДамін, 3,5% Охівір Plus від ДР 2.1.5, ДР 2.1.6.

Контроль мікробної контамінації внутрішньої поверхні приміщень проводять не рідше одного разу на тиждень під час виробничого процесу і не рідше одного разу на місяць після дезобробки.

На поверхні виробничих приміщень безпосередньо після дезобробки не повинно бути життєздатних мікроорганізмів.

Відпрацьовані розчини направляються на знешкодження (ЗВ 15.3.1).

ДР 2.2.2 Генеральне прибирання

При генеральному прибиранні застосовують 0,5 % розчин Біомою, який чергують з препаратом 0,3% Хлорантоїном разом з деззасобами, Антихлор 1%, Охівір Plus 3,5% від ДР 2.1.2, ДР 2.1.4, ДР 2.1.6, ДР 2.1.5.

Генеральне прибирання приміщень здійснюють один раз на тиждень. На поверхні виробничих приміщень безпосередньо після дезобробки не повинно бути життєздатних мікроорганізмів.

Відпрацьовані розчини направляються на знешкодження (ЗВ 15.3.1).

ДР 2.3. Підготовка обладнання

ДР 2.3.1 Миття та дезінфекція обладнання

Миття обладнання проводять на початку або вкінці зміни за допомоги розчину 0,3% Біомою від ДР 2.1.1 з питною теплою водою (40-45 °С) та дезінфікується Вітоксид Нітро. Дані миючі і дезінфікуючі засоби змінюємо один раз на місяць відповідно на 0,2% Хлорантоїн та 1% Антихлор від ДР 2.1.3. Відпрацьовані розчини направляються на знешкодження (ЗВ 15.3.1)

ДР 2.3.2 Ополіскування обладнання

Обладнання після миття потрібно ополоснути очищеною водою температурою 30-40 °С.

Відпрацьовані розчини направляються на знешкодження (ЗВ 15.3.1).

ДР 2.3.3 Технічний огляд обладнання

Технічний огляд проводимо, щоб впевнитися що обладнання справне. Якщо виявляються нещільності, проводяться підтягнення різьбових з'єднань.

ДР 2.3.4 Перевірка обладнання на герметичність

Перевірка на герметичність ємнісного обладнання відбувається стисненим повітрям від ДР 1.2.8, яке подають для створення надлишкового тиску (до 0,2 МПа). Усі з'єднання та клапани слід обробити мильним розчином. Перевіряють упродовж 30 хв за манометром. Якщо тиск не змінюється, апарат герметичний, якщо негерметичний будуть на місцях з'єднання утворюватися мильні бульбашки.

ДР 2.3.5 Стерилізація обладнання

Для стерилізації ємнісного обладнання потрібно відкрити усю запірну арматуру на комунікаціях та обладнанні і подати гостру пару в апарат через барботер. Обов'язково відкрити вентиль відпрацьованого повітря (для виходу повітря з апарату). Спостерігаючи за температурою (130-135°С), при її досягненні, закрити запірну арматуру і залишити в такому стані (0,3 МПа, 2 год). Конденсат, що утворився направляється на утилізацію.

ДР 2.4. Підготовка персоналу

Персонал, який задіяний на виробництві має пройти навчання, інструктаж та санітарно-гігієнічну підготовку.

ДР 2.4.1 Навчання та інструктаж

Навчання та інструктаж персоналу проводиться раз на місяць. Підприємство має вести журнал обліку в якому кожен працівник відмічається про проходження інструктажу. Види навчання працівників: основне (раз на рік), вхідне (для нових працівників), подальше (систематичне).

ДР 2.4.2 Санітарна підготовка

Персонал повинен періодично перевіряти стан свого здоров'я. Обов'язково співробітники мають переодягатися і митися, щоб звести до мінімуму ризик контамінації одягу для роботи в чистих зонах і запобігти контамінації. Персонал, що працює у виробничому приміщенні, повинен бути одягнений у спеціальний одяг, що відповідає виробничим операціям, які вони виконують. У класі чистоти В (з зоною А) на працівниках повинен бути стерильний брючний костюм, тканина якого не виділяє часток. Штани заправлені у бахіли, а рукави в рукавички. Обов'язково мати головний убір, бахіли, маску, гумові рукавички. У класі чистоти С, волосся повинно бути покритим. Варто носити костюм зі штанами (суцільний), що щільно облягає зап'ястя, з високим коміром і відповідне взуття або бахіли. Одяг і взуття не повинні виділяти ворс або частки. Одяг рекомендується змінювати не рідше 1-го разу в день, а захисну маску кожні 2 години. Гумові рукавички варто змінювати після кожного контакту зі шкірою обличчя, а також у будь-якому випадку, коли виникла небезпека їхнього забруднення. Для обробки та дезінфекції рук використовувати засіб «Alsoft V», який у готовій формі наявний на виробництві. Замінювати раз на місяць засобом «Септаль».

ДР 3. Приготування допоміжних розчинів

ДР 3.1. Приготування та стерилізація титрувального агенту 6% NaOH.

Розчин додають у поживне середовище з інокулятом в посівний апарат (ФР-17) (25 л) і ферментер (ФР-28) (250 л).

ДР 3.1.1 Приготування та стерилізація титрувального агенту 6% NaOH для посівного апарату..

Розчин лугу додаємо в охолоджене поживне середовище в посівний апарат (ФР-17) з робочим об'ємом 15,4 л.

Розраховуємо потрібну кількість 6% NaOH:

$$0,2\% \times 15,4 = 0,0308 \text{ л}$$

Для приготування 30,8 мл титрувального агенту, зважуємо на технічних вагах 1,7 г NaOH. Наважку переносимо в колбу об'ємом 100 мл. Мірним циліндром вимірюють 29,1 мл дистильованої води та доливають в колбу до лугу, перемішують закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві.

Розчин повинен бути стерильним, так як подається у стерильне поживне середовище. Отже, проводимо стерилізацію при температурі 131°C протягом 40 хв при 0,15 МПа. Простерилізований розчин до *ТП 6.5*.

ДР 3.1.2 Приготування та стерилізація титрувального агенту 6% NaOH для ферментера.

Розраховуємо потрібну кількість 6% NaOH:

$$0,2\% \times 154 = 0,308 \text{ л}$$

Для приготування 308 мл титрувального агенту, зважуємо на технічних вагах 17 г NaOH. Наважку переносимо в колбу об'ємом 1 л. Мірним циліндром вимірюють 291 мл дистильованої води та доливають в колбу до лугу, перемішують закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хв при 0,15 МПа. Простерилізований розчин до *ТП 7.1*.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в термостаті.

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 1450 мл середовища, тоді загальна кількість води, яку необхідно додати становить 1252,6 мл. Джерелом вуглецю в середовищі є сахароза, джерелом азоту – панкреатичний гідролізат казеїну та дріжджовий екстракт. Вміст компонентів для приготування 1450 мл середовища наведено в *табл. 7.1*.

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1450 мл
середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1450 мл (г)	Композиція	Об'єм води, мл	Об'єм композиції, мл
Панкреатичний гідролізат казеїну	12	17,35	А	110,26	127,61
Твін 80	1	1,451	Б	907,54	1050,331
Дріжджовий екстракт	35,5	51,45			
Сахароза	62	89,89			
Цитрат натрію	22	31,94	В	234,752	271,693
Лимонна кислота	1,35	1,958			
MgSO ₄ ×7H ₂ O	2	2,898			
MnSO ₄ ×5H ₂ O	0,1	0,145			
			Всього:	1252,6	1450

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 17,35 г панкреатичного гідролізату казеїну. Наважку поміщають у колбу об'ємом 300 мл, додають 110,26 мл холодної водопровідної води, перемішують щоб суспендувати. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 120°C та тиску 0,1 МПа упродовж 30 хв. До ТП 6.4, ЗВ 15.2.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 89,89 г сахарози, 51,45 г дріжджового екстракту та 1,451 г твіну-80. Наважки поміщають у попередньо протаровану колбу об'ємом 2 л, додають 907,54 мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C та тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв. До ТП 6.4, ЗВ 15.2.

ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 31,94 г цитрату натрію, 1,958 г лимонної кислоти, 2,898 г MgSO₄×7H₂O та 0,145 г MnSO₄×5H₂O. Наважки поміщають у

колбу 500 мл, додають 234,752 мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C та тиску 0,15 МПа протягом 60 хв. До ТП 6.4, ЗВ 15.2.

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті.

Поживне середовище для культивування в посівному апараті (ФР-17) об'ємом 25 л, при коефіцієнті заповнення 0,7 буде складати 15,4 л. Стерилізація композицій А та В здійснюється в автоклаві, композиції Б - в реакторі-змішувачі (РЗ-16). Конденсат становить 1,54 л. Тому, загальну кількість води, яку необхідно додати для приготування поживного середовища становить 11,767 л. (табл. 7.2).

Таблиця 7.2

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 15,4 л
середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 15,4 л (кг)	Композиція	Об'єм води, л	Об'єм композиції, л
Панкреатичний гідролізат казеїну	12	0,184	А	0,936	1,328
Твін 80	1	0,0154	Б	8,343	10,71
Дріжджовий екстракт	35,5	0,546			
Сахароза	62	0,955			
Цитрат натрію	22	0,339	В	2,488	3,46
Лимонна кислота	1,35	0,0208			
MgSO ₄ ×7H ₂ O	2	0,0308			
MnSO ₄ ×5H ₂ O	0,1	0,00154			
			Всього:	11,767	15,4

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 0,184 кг панкреатичного гідролізату казеїну. Наважку поміщають у попередньо відтаровану колбу об'ємом 3 л, додають 0,936 л холодної водопровідної води, перемішують щоб

суспендувати. Закривають і стерилізують в автоклаві при температурі 120°C та тиску 0,1 МПа упродовж 30 хв. Простерилізована композиція надходить до *ТП 6.5*. Відходи на знешкодження до *ЗВ 15.2*.

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,955 кг сахарози, 0,546 кг дріжджового екстракту та 0,0154 кг твіну-80. Наважки поміщають у реактор-змішувач (РЗ-16) об'ємом 20 л, додають 8,343 л водопровідної води. Закривають, перемішують і стерилізують при температурі 112°C та тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв. Простерилізована композиція самоплином надходить до *ТП 6.5*. Відходи на знешкодження до *ЗВ 15.2*.

ДР 4.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 0,339 кг цитрату натрію, 0,0208 кг лимонної кислоти, 0,0308 кг $MgSO_4 \times 7H_2O$ та 0,00154 кг $MnSO_4 \times 5H_2O$. Наважки поміщають у колбу об'ємом 5 л додають 2,488 л водопровідної води, перемішують, закривають і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C та тиску 0,15 МПа протягом 60 хв. Простерилізована композиція надходить до *ТП 6.5*. Відходи на знешкодження до *ЗВ 15.2*.

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в ферментері.

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 154 л поживного середовища. Стерилізація композиції А і композиції Б здійснюються у окремих реакторах (РЗ-18, РЗ-21). Композиція В готується у збірнику (З-22), а стерилізується безпосередньо у ферментері (ФР-28). Загальний об'єм конденсату для композицій становить 23,1 л. Тому, загальна кількість води, яку треба додати для приготування поживного середовища становить 110 л. (табл. 7.3).

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 154 л
середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,154 м ³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм води, л	Об'єм композиції, л
Панкреатичний гідролізат казеїну	12	1,845	А	9,68	11,53
Твін 80	1	0,154	Б	79,68	94,82
Дріжджовий екстракт	35,5	5,46			
Сахароза	62	9,53			
Цитрат натрію	22	3,38	В	20,613	24,52
Лимонна кислота	1,35	0,208			
MgSO ₄ ×7H ₂ O	2	0,3			
MnSO ₄ ×5H ₂ O	0,1	0,0154			
			Всього:	110	154

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1,845 кг панкреатичного гідролізату казеїну. Наважку поміщають у реактор-змішувач об'ємом 20 л (РЗ-18), додають 9,68 л холодної водопровідної води, перемішують щоб суспендувати. Стерилізують при температурі 120°C та тиску 0,1 МПа упродовж 30 хв.

Простерилізована композиція надходить до ТП 7.1 за допомогою перистальтичного насосу (Н-23). Відходи на знешкодження до ЗВ 15.2.

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На ваговому дозаторі (Д-19) зважують 9,53 кг сахарози, 5,46 кг дріжджового екстракту. За допомоги технічних ваг зважують 0,154 кг твіну-80. Наважки поміщають у реактор-змішувач об'ємом 150 л (РЗ-21), додають 79,68 л водопровідної води. Закривають, перемішують і стерилізують при температурі 112°C та тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв.

Простерилізована композиція надходить до *ТП 7.1* за допомогою перистальтичного насосу (Н-24). Відходи на знешкодження до *ЗВ 15.2*.

ДР 4.3.3. Приготування і стерилізація композиції В

На ваговому дозаторі (Д-20) зважують 3,38 кг цитрату натрію. Наважки 0,208 кг лимонної кислоти, 0,3 кг $MgSO_4 \times 7H_2O$ та 0,0154 кг $MnSO_4 \times 5H_2O$ зважують на технічних вагах. Всі зважені компоненти поміщають у збірник 40 л (З-22), додають 20,613 л водопровідної води, закривають та перемішують. Стерилізують при температурі 131°C та тиску 0,15 МПа протягом 60 хв безпосередньо у самому ферментері (ФР-28), куди композиції надходять за допомогою відцентрового насосу (Н-27). Відходи на знешкодження до *ЗВ 15.2*.

ДР 5. Приготування захисного середовища

ДР 5.1 Приготування та стерилізація захисного середовища у колбі

Для приготування 3,3 л захисного середовища, на технічних вагах зважують 132 г желатину та висипають у колбу об'ємом 1 л. Додаємо 800 мл очищеної води температурою 40°C та перемішуємо. Після змішування розчин залишають для набухання на 3 год. Далі підігривають суспензію на водяній бані до 50-60°C і перемішують, для повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують при температурі 130°C, тиску 0,18 МПа протягом 2 год До *ТП 10.1*.

Одночасно готуємо сахарозо-молочний розчин. Зважуємо на технічних вагах 264 г сахарози та 198 г сухого знежиреного молока. Переносимо у колбу об'ємом 3 л та додаємо 1,9 л очищеної води температурою 35-40°C. Суміш перемішуємо до однорідної маси. Далі проводимо стерилізацію при температурі 112°C та тиску 0,15 МПа упродовж 20 хв. Простерилізоване захисне середовище охолоджуємо до 35-40°C. До *ТП 10.1*.

Обов'язково здійснюємо контроль стерильності середовища висівом на МПА і середовище Сабуро. Захисне середовище вважається стерильним, коли на посівах відсутній ріст мікробіоти.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Lactobacillus fermentum* F6 зберігають у ліофілізованому стані при -80°C у флаконах. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах [6].

ТП 6.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру, що зберігалася у флаконах, розсівають методом виснажуючого штриха на МРС агар у чашках Петрі до ізольованих колоній та вирощують у термостаті при температурі 37°C упродовж 12 год. До ТП 6.3

ТП 6.3 Вирощування інокуляту на агаризованих середовищах

Ізольовані колонії (від ТП 6.2) пересівають уколом в пробірки з МРС агаром (1 колонія для 1 пробірки). Відстань між колоніями має бути не менше 1 см. Час культивування – 12-15 год. Мікробіологічний контроль культури (кожні 5-6 год) здійснюють мікроскопіюванням [6].

ТП 6.4. Вирощування культури в термостаті

Композиції А, Б, В (від ДР 4.1.1, ДР 4.1.2, ДР 4.1.3) в асептичних умовах зливають у колбу об'ємом 2 л, перемішують і розливають по 362,5 мл у 4 стерильні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Lactobacillus fermentum* F6, вирощену у МРС агарі, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з 1 пробірки.

Мікробіологічний контроль культури (кожні 5-6 год) здійснюють мікроскопіюванням. Після вирощування у термостаті упродовж 12-15 год культуральну рідину з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 1 л. До ТП 6.5 [6].

ТП 6.5. Вирощування інокуляту в посівному апараті

В боксі в асептичних умовах у спеціальний балон для асептичної передачі зливають розчин з панкреатичним гідролізатом казеїну (від ДР 4.2.1), та сахарозою, дріжджовим екстрактом та твіном-80 (РЗ-16) (від ДР

4.2.2), та розчин солей (композиція В від ДР 4.2.3) перемішують і отриманий розчин асептично через колектор передають в посівний апарат (ФР-17). Вмикають перемішуючий пристрій спочатку 40 об/хв збільшуючи до 100 об/хв, періодично виключаючи мішалку. Через засівну колбу вносять 1,6 л посівного матеріалу (від ТП 6.4).

Вирощування в інокуляторі ведеться при 37°C, 12-15 год. Через трубу, яка розташована на відстані 15 см від поживного середовища подають стерильне аераційне повітря. Тиск в апараті підтримуємо на рівні 0,01 МПа. В процесі культивування для стабілізації рН на рівні значення 4-4,5 використовують розчин 6%-ого NaOH (від ДР 3.1.1). До ТП 7.1.

Відпрацьоване повітря направляється на знешкодження (ЗВ 15.1).

ТП 7. Біосинтез

ТП 7.1. Виробниче культивування.

У попередньо простерилізований ферментер (ФР-28) об'ємом 250 л в якому вже міститься готова композиція В (ДР 4.3.3) (З-22) (надійшла за допомогою відцентрового насосу (Н-27)), перекачують за допомогою перестальтичних насосів (Н-23, Н-24), простерилізоване поживне середовище (від ДР 4.3.1 та ДР 4.3.2) (РЗ-18, РЗ-21 відповідно). Вмикаємо перемішуючий пристрій (40 об/хв). Через трубу перетискування перекачують з посівного апарату інокулят від ТП 6.5. Через трубу, яка розташована на відстані 15 см над поверхнею поживного середовища, подаємо стерильне аераційне повітря. Культивування проводять при тиску 0,01 МПа. Упродовж процесу біосинтезу періодично (щогодини на 10 хв) вмикають перемішувальний пристрій (100 об/хв). Перевіряють кислотність середовища за допомогою рН-метра і нейтралізують розчином лугу (від ДР 3.1.2).

Процес культивування зупиняють після досягнення концентрації лактобактерій на рівні $2,3 \times 10^{10}$ КУО/см³ та стабілізації рівня рН 5,9, що свідчить про закінчення росту та розмноження клітин. Під час культивування беруть пробу для мікробіологічного контролю на відсутність сторонньої мікробіоти [6].

Через 24 год здійснюють мікробіологічний контроль як описано вище, а також визначають концентрацію біомаси, яка має бути не нижче ніж 10^9 КУО/см³.

Культуральна рідина на зберігання до ТП 8. Відпрацьоване повітря направляється на знешкодження (ЗВ 15.1).

ТП 8 Зберігання культуральної рідини

Культуральна рідина об'ємом 152 л після ферментера перистальтичним насосом (Н-25) перекачується у збірник об'ємом 160 л (З-29), де зберігається до моменту перекачування у центрифугу (Ц-30) до ТП 9.1.

ТП 9. Відділення біомаси

ТП 9.1 Центрифугування культуральної рідини

Культуральна рідина перистальтичним насосом (Н-26) надходить у осадову центрифугу зі шнековою вигрузкою осаду (Ц-30). Центрифугування проходить при 6000 об/хв впродовж 40 хв. Далі супернатант йде на утилізацію (до ЗВ 15.3.2), а біомасу змішуємо з захисним середовищем (до ТП 10.1).

ТП 10. Отримання напівфабрикату

ТП 10.1 Змішування з захисним середовищем

У реактор-змішувач об'ємом 20 л (РЗ-31), в асептичних умовах з колб переливаємо жалатин та сахарозо-молочну суміш від ДР 5.1. Вмикаємо мішалку та перемішуємо при 40 об/хв, 20 хв. Після повного змішування компонентів, додаємо біомасу у кількості 11 кг від ТП 9.1, та змішуємо її з захисним середовищем при 40 об/хв. До ТП 11.1.

ТП 11. Сублімаційне сушіння

ТП 11.1 Ліофілізація

У ліофілізатор (С-32) поміщаємо 14,3 кг біомаси з захисним середовищем від ТП 10.1. Розподілюємо весь матеріал на 3 полицках і герметично закриваємо сушарку. Після завантаження матеріалу відбувається заморожування при температурі - 20 °С. Коли матеріал заморозився вмикається режим ліофілізації замороженого матеріалу у вакуумі (вмикається насос) за температури $t = -(50,3-51,2)^\circ\text{C}$ та тиску $P = (0,01-0,03)$ атм.

Досушування матеріалу за температури 40°C. Заключним етапом є з'єднання камер сублімації та десублімації з атмосферою, вивантаження сухого матеріалу. Час усього процесу 28 год. Отриману ліофілізовану біомасу накривають стерильними безворсовими серветками та направляють до *ТП 12.1.*

ТП 12. Подрібнення

ТП 12.1 Подрібнення молотковою дробаркою

Після стадії ліофілізації, ми отримуємо суцільний твердий корж від *ТП 11.1.* Щоб подрібнити його до стану порошку, використовуємо молоткову дробарку (Д-33). Подрібнюємо до розміру часток - 0,25 мм. Подрібнений матеріал подаємо накритим стерильними безворсовими серветками до *ТП 13.1.* Погано подрібнений матеріал після просіювання надходить повторно від *ДР 13.1.*

ТП 13. Просіювання

ТП 13.1 Просіювання на вібраційному ситі

Розмір часток не завжди може бути однаковим після подрібнення *ТП 12.1.* Щоб забезпечити продукт в якому всі частки будуть одного розміру, просіюємо порошок на вібраційному ситі (ВС-34). Всі частки, що більші за потрібні розміри надходять знову на етап подрібнення молотковою дробаркою (Д-33) *ТП 12.1.* Сухий однорідний порошок (покритий стерильними безворсовими серветками) йде на стадію пакування до *ТП 14.1.*

ПМВ 14. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 14.1. Наповнення капсул

Пакування у первинну тару, проводимо на автоматизованій лінії пакування (АВ-35). Вже готові капсули надходять на виробництво. Потім їх подають на автоматизовану лінію. Далі вони наповнюються порошком (у кожную капсулу по 90 мг). Продуктивність 3000 капсул/год.

ПМВ 14.2. Упаковка капсул у флакони

Після наповнення, капсули надходять на лінію упаковки у флакони (АВ-36). Створюючи вібрацію капсули обертаються по бункеру-вібростолу,

шикуюються по черзі, проходячи через оптичний датчик вони підраховуються і фасуються у тару. У кожний флакон автомат відраховує 30 капсул. Оператор повинен змінювати тару після фасування.

ПМВ 14.3. Пакування флаконів у пачки та їх маркування

Наповненні флакони надходять на автоматизовану лінію пакування у пачки (АВ-37). Картонні пачки під дією вакууму подаються з магазину картонних пачок у вузол подачі, де формуються у правильну форму. Магазин за допомогою пневмоциліндра подає наповнений флакон і складену інструкцію, після чого вкладає їх всередину пачки. Далі наповнена коробка закривається, маркується відповідною інформацією і надходить у лоток. Браковані пачки на знешкодження *ЗВ 15.2.*

ПМВ 14.4. Складання пачок з флаконами у гофрокороб та відвантаження

Упаковка пачок з флаконами в гофрокороб здійснюється вручну. Готові упаковані засоби, працівник складає у групову коробку, заклеює стрічкою пакувальною і етикеткою. Упакована продукція зберігається в захищеному від світла та вологи місці при температурі не більше 20°C.

ЗВ 15. Знешкодження відходів

ЗВ 15.1. Знешкодження газоподібних відходів

Щоб знешкодити газоподібні відходи виробництва використовуємо абсорбер. Процес полягає в тому, що у абсорбер надходить загазоване повітря, яке барботує через шар рідини, таким чином звільняючись від шкідливих для навколишнього середовища речовин. Очищене повітря виходить через патрубков. Від ДР 2.3.4, ТП 6.5, ТП 7.1.

ЗВ 15.2. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи виробництва знешкоджуються методом піролізу. Відходи піддаються впливу високій температурі $t=550\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 хв з наступною активацією отриманих карбонізаторів в середовищі CO_2 при $t=900\text{ }^{\circ}\text{C}$. На виході отримуємо активоване вугілля, яке може бути використане в системах

водоочищення. Від ДР 2.1, ДР 4.1.1, ДР 4.1.2, ДР 4.1.3, ДР 4.2.1, ДР 4.2.2, ДР 4.2.3, ДР 4.3.1, ДР 4.3.2, ДР 4.3.3, ПМВ 14.3.

ЗВ 15.3. Знешкодження рідких відходів

ЗВ 15.3.1 Знешкодження відходів після миття

Використовуємо установку знезараження і регенерації відпрацьованих миючих розчинів. Рідкі відходи поступають у електрореактор, де за допомогою електродів, які виробляють коагулянт і газ, очищується забруднена вода. Домішки видаляють ежекторним пристроєм. Від ДР 2.2.1, ДР 2.2.2, ДР 2.3.1, ДР 2.3.2.

ЗВ 15.3.2 Знешкодження відцентрифугованого супернатанту

Для цього застосовуємо біологічний фільтр високого навантаження. Відходи подаються у фільтр, де очищуються біоплівкою. Розподіл стічної води по поверхні біофільтрів здійснюється нерухомими розбризкувачами або рухомими реактивними зрошувачами. Від ТП 9.1.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Таблиця 8.1

Карта контрольних точок виробництва біомаси *Lactobacillus fermentum*

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт 1.2.2 Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E=80%, тиск згідно паспорту
Кт 1.2.3 Стиснення повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P=0,35-0,5 МПа t=200 °C
Кт 1.2.4 Охолодження повітря	Охолоджене повітря, температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	t=25-40 °C
Кт 1.2.5 Видалення зайвої вологи	Повітря після видалення зайвої вологи	Психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	W=60-70%
Кт 1.2.6 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t=45-50 °C, W=50%
Кт 1.2.7 Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі тонкого очищення	E=95%
Кт 1.2.8 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі	E=99,995%

НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Максимець О.О.			
Перевір.	Грегірчак Н.М.			
Консультант				
Н.Контр.				
Затверд.	Пирог Т.П.			
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва			Літ.	Арк.
				98
			Акрушів 142 100	
			Кафедра БТМ	

Продовження табл. 8.1

Кт, Кх, Км 3.1.1, 3.1.2 Приготування та стерилізація титрувального агенту 6% NaOH	Розчин гідроксиду натрію Тиск, температура, час, концентрація, стерильність	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль проводиться після стерилізації	$\tau=40$ хв, $P=0,15$ МПа, 6%, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.1, 4.2.1, 4.3.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль проводиться після стерилізації	$\tau=30$ хв, $P=0,1$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2, 4.2.2, 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, час, тиск, стерильність	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль проводиться після стерилізації	$\tau=30$ хв, $P=0,05$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.3, 4.2.3, 4.3.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В Температура, час, тиск, стерильність	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль проводиться після стерилізації	$\tau=60$ хв, $P=0,15$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 6.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура <i>Lactobacillus fermentum</i> F6 Температура, час, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 1-2 місяці	$t=-80$ °С, $\tau=3-4$ місяці, відсутність мікробіоти

Кт, Км 6.2 Одержання робочої культури	Колекційна культура <i>Lactobacillus fermentum</i> F6 Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 5-6 годин	t=37 °C, τ=12 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.3 Вирощування інокуляту на агаризованих середовищах	Колекційна культура <i>Lactobacillus fermentum</i> F6 Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури, морфологічна однорідність	Термометр, годинник, мікроскоп	Мікробіологічний контроль проводять кожні 5-6 годин	t=37 °C, τ=12-15 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.4. Вирощування культури в термостаті	Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, технічний мікробіологічний контроль	Температура підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 5-6 годин	t=37 °C, τ=12-15 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 6.5 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом в 25 л	Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, рівень рН, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Термометр технічний, годинник, манометр, технічний тахометр, мікробіологічний контроль, мікроскоп	Температура і швидкість обертання на початку культивування – 40 об/хв і збільшуючи до 100 об/хв, рівень рН контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 5-6 годин	t=37°C, τ=12-15 год, w=40-100 об/хв, рН=5,9 відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Кх, Км 7.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 250 л	Культуральна рідина Температура, тривалість культивування, частота обертів мішалки, рівень рН, тиск, мікробіологічна чистота культури, рівень біомаси	Термометр технічний, годинник технічний, тахометр, датчик рН, манометр, мікроскоп, спектрофотометр	Температура, швидкість обертання мішалки на початку культивування – 40 об/хв і збільшуючи до 100 об/хв, рівень рН, тиск контролюється весь час, мікроскопіювання – кожні 5-6 годин	t=37 °С, τ=24 год, w=40-100 об/хв, рН=5,9, Р=0,01-0,3 МПа, відсутність сторонньої мікробіоти.
---	--	---	---	--

8.2. Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ здійснюють шляхом розсівання проби простерилізованого поживного середовища на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем: СА – для виявлення грибів і дріжджів і МПА – для виявлення бактерій. Пробу простерилізованого поживного середовища відбирають в об'ємі 50 мл [137].

Підготовка чашок Петрі. У попередньо простерилізовані в сухожаровій шафі чашки Петрі розливають по 20-30 мл розплавленого на киплячій водяній бані поживного середовища. Чашки залишають на рівній поверхні для рівномірного застигання агару і витримують протягом 2-3 діб при температурі 30°C кришками донизу [137].

Посіви здійснюють шляхом відбору стерильною піпеткою 0,1 мл з об'єму проби простерилізованого поживного середовища і нанесення її на поверхню відповідного поживного середовища. Внесену пробу рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами завертають у папір і поміщають у термостат для інкубації при температурі 32-34 °С протягом 1-2 діб для МПА та при температурі 24-26 °С протягом 3-5 діб для СА [137].

Для виявлення сторонньої факультативно анаеробної мікробіоти використовуємо тіогліколеве середовище. Зразок або його суспензію вносять у стерильне середовище в пробірках, та культивують при 37°C протягом 24-48 год. Паралельно залишається незасіяна пробірка як контроль. При мікробіологічному забрудненні середовище мутніє, аероби утворюють помутніння у верхній частині пробірки, анаероби у нижній [138].

В процесі глибинного посіву факультативних анаеробів голкою у товщу стовпчика потрібно звернути увагу на те, що пробірку необхідно тримати догори ногами для запобігання потрапляння у пробірку забруднювачів з повітря [139].

На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів.

8.3. Показники росту

8.3.1 Концентрація біомаси

Для визначення концентрації біомаси *Lactobacillus fermentum* F6 відбирають пробу культуральної рідини 1 мл та вносять у пробірку з 9 мл стерильної води. Вміст пробірки перемішують та вимірюють його оптичну щільність за допомогою спектрофотометра. Кювети обираємо з довжиною оптичного шляху 100 мм. Для контролю в іншу кювету наливаємо стерильну воду. Прилад НІТАСНІ U-2900 вимірює довжину хвилі на 600 нм (рис. 8.1). Далі за допомогою калібрувального графіка розраховуємо біомасу бактерій [6].



Рис. 8.1. Спектрофотометр НІТАСНІ U-2900

8.3.2. Визначення концентрацій джерел вуглецю та азоту

Визначення концентрації джерела вуглецю (сахароза) - перманганатний метод Бертрана.

Проведення досліджу: Спочатку необхідно відокремити клітини (біомасу) *Lactobacillus fermentum* від культуральної рідини. 20 мл культуральної рідини центрифугували при 5000 об/хв протягом 15 хв [23].

Принцип методу: Метод заснований на здатності карбонільних груп цукрів відновлювати в лужному середовищі оксид міді (II) до оксиду міді (I). При розчиненні сульфатом заліза (III) амонію утворився оксид міді (I), окислюючись до оксиду міді (II), відновлює залізо (III) в залізо (II), кількість якого визначають титруванням розчином перманганату калію [140].

Техніка визначення: У конічну колбу місткістю 200 – 250 мл вносять піпеткою 20 мл супернатант культуральної рідини, доливають по 20 мл розчину сульфату міді (Фелінга 1) і сегнетової солі (Фелінга 2). Суміш обережно перемішують, нагрівають і кип'ятять рівно 3 хв. з моменту утворення бульбашок потім знімають з вогню і дають осаду осісти. Рідина над осадом повинна бути яскраво-синьою [140].

Далі гарячу рідину фільтрують через воронку зі скляним фільтром в колбу для відсмоктування, користуючись водоструминним або вакуумним насосом для відсмоктування рідини, уникаючи перенесення осаду на фільтр. Коли вся рідина буде відфільтрована, колбу з осадом і фільтр промивають кілька разів невеликими порціями гарячої дистильованої води до зникнення лужної реакції промивних вод [140].

Осад оксиду міді (I) повинен бути весь час покритий рідиною, щоб уникнути зіткнення його з повітрям і переходу оксиду міді (I) в оксид міді (II). Закінчивши промивання, фільтр вставляють в чисту колбу для відсмоктування або залишають в тій же колбі, попередньо звільнивши і ретельно сполоснувши її від фільтрату і промивних вод. Відмірюють 20 мл розчину сульфату амонію заліза (III), вносять його в конічну колбу з залишком оксиду міді і по розчиненні переносять на фільтр, від'єднавши водоструминний насос або

насос Комовського. Дають кілька хвилин постояти для розчинення осаду, а потім повільно фільтрують відсмоктуванням [140].

Колбу і фільтр кілька разів промивають водою до зникнення кислої реакції, даючи кожен раз рідини стекти з фільтра. Отриманий зеленуватий розчин в колбі для відсмоктування титрують розчином перманганату калію до появи слабо-рожевого забарвлення, що зберігається протягом 1 хв [140].

Витрачений на титрування кількість мл перманганату калію множать на його титр по міді (Т / Сu) і по за таблицею визначають кількість сахарози [140].

Визначення концентрації джерела азоту (панкреатичний гідролізат казеїну, дріжджовий екстракт) методом Серенсена (формольне титрування).

Принцип методу: метод заснований на захисті формальдегідом вільних аміногруп з утворенням метиленових з'єднань. При цьому аміногрупи втрачають свої основні властивості, карбоксильна група відтитровується їдким лугом. При цьому вважають, що кількість титруємих карбоксильних груп еквівалентно кількості зв'язаних формальдегідом амінних груп [141-144].

Перелік необхідних матеріалів та реактивів: 1% розчин формальдегіду, 0,1 М натрію гідроксиду, 10% натрію гідроксиду, 0,1 М соляної кислоти, круглодонні колби.

Техніка проведення:

Супернатант культуральної рідини в об'ємі 20 мл поміщають в круглодонну колбу, нейтралізують потенціометрично до рН 7,0, шляхом додавання 0,1 М розчину натрію гідроксиду або 0,1 М соляної кислоти. Після закінчення нейтралізації додають від 5 мл формальдегіду, нейтралізованого в день аналізу натрію гідроксиду розчином 10% до рН 7,0, перемішують і титрують 0,1 М розчином натрію гідроксиду до значення рН 9,1 або до появи слаборожевого фарбування, яке не змінюється при перемішуванні протягом 2 хв [142-144].

Паралельно проводять контрольний дослід. При визначенні амінного азоту 1 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду відповідає 1,4 мг амінного азоту [142-144].

8.4. Показники якості готового продукту

Методи контролю препарату пробіотика Фарманкс Про-Бі проводяться згідно Аналітично нормативної документації (АНД) [145].

8.4.1. Зовнішній вигляд пробіотика Фарманкс Про-Бі

Порошок (кристалічна або пориста маса) майже білого кольору різної інтенсивності з специфічним запахом і смаком. Визначають візуально, органолептично.

8.4.2. Автентичність препарату пробіотика Фарманкс Про-Бі

Грампозитивні, анаеробні бактерії, не утворюють спор. Форма клітин: прямі палички з округлими кінцями 3-8 мкм, розташовуються ланцюжками, не рухомі. На щільних поживних середовищах формують округлі колонії, гладенькі, непрозорі (білі або кремові) з рівними чіткими краями.

Визначають бактеріоскопічно.

8.4.3. Розпадання

Тверді та м'які капсули мають витримувати випробування на розпадання таблеток або капсул за методикою, наведеною у ДФУ (2.9.1, с. 151).

Для контролю цього показника потрібен спеціальний пристрій (рис.8.2).

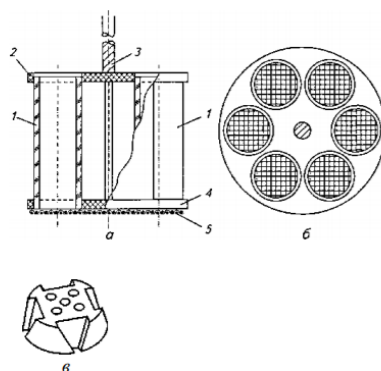


Рис. 8.2. Пристрій приладу для визначення розпадання капсул (за ДФУ): а-вид збоку; б-вид зверху; в-пластмасовий диск

Робоча частина зазначеного приладу складається з жорсткого кошику з сітчастим дном, що підтримує шість циліндричних скляних трубок (1). Кожна трубка забезпечена циліндричним диском (рис. 4.1, в) з прозорої пластмаси. Скляні трубки утримуються вертикально зверху і знизу двома накладними прозорими пластмасовими пластинами 2 і 4.

До нижньої поверхні нижньої пластини прикріплена сітка 5 з нержавіючого сталевого дроту. Пластини утримуються жорстко вертикальними металевими стрижнями по колу. Ще один металевий стрижень 3 прикріплений до центру верхньої пластини, що дозволяє прикріпити кошик до механічного пристрою, який може піднімати і опускати її плавно з постійною частотою в межах 28 – 32 циклів/хв на відстань від 50 до 60 мм.

Кошик поміщають в рідину, зазначену у відповідній аналітичній нормативній документації (АНД), в підхожій посудині (в склянці місткістю 1 л). Обсяг рідини повинен бути таким, що, коли кошик знаходиться в крайньому верхньому положенні, сітка повинна бути, як мінімум, на 15 мм нижче поверхні рідини; коли ж кошик знаходиться в самому нижньому положенні, сітка повинна бути на 25 мм вище дна посудини, а верхні відкриті кінці скляних трубок – над поверхнею рідини. Температуру рідини від 36 до 38°C підтримують за допомогою відповідного пристрою. Конструкція кошика може змінюватися за умови дотримання зазначених вище вимог для скляних трубок і дротяної сітки.

У кожному з шести трубок поміщають одну капсулу. Опускають кошик в посудину з рідиною. Включають прилад, після закінчення зазначеного часу кошик виймають і досліджують стан таблеток. Препарат витримує випробування, якщо розпалися всі таблетки або капсули. Випробування на розпаданню витримано, коли на сітці:

- а) немає залишку;
- б) є залишок, що складається з м'якої маси, яка не має відчутно твердого незмочувального ядра;

в) є тільки фрагменти покриття капсули або тільки фрагменти оболонки на сітці.

8.4.4. Розчинення

При додаванні води із розрахунку 1 мл на 1 дозу препарату протягом 5 хвилин утвориться гомогенна завись сірувато-бежевого кольору. Визначають візуально.

8.4.5. Однорідність вмісту

Однорідність маси для одиниці дозованого ЛП оцінюється згідно з методикою ДФУ (2.9.5, с. 157). Припустиме відхилення не повинно перевищувати 10% при середній масі <300 мг і 7,5% для капсул з середньою масою ≥ 300 мг.

Вміст капсул оцінюється відповідно до методики ДФУ (2.96, с. 158).

Точно зважують кожну з 10 відібраних капсул, ретельно стежачи за їх цілісністю. Витягають вміст кожної капсули підходящим способом. Точно зважують кожну зі спорожнених оболонок і розраховують для кожної капсули масу вмісту, віднімаючи масу оболонки від відповідної загальної маси. Розраховують вміст діючої речовини в кожній капсулі виходячи з маси вмісту, витягнутого з окремої капсули та результату кількісного визначення.

Препарат витримує випробування, якщо вміст не більше ніж в одній одиниці виходить за межі 85–115% і в жодній одиниці не виходить за межі 75–125% від середнього вмісту в препараті. Вміст діючої речовини у капсулі, якщо немає інших зазначень в окремій статті, має становити при дозуванні менше 1 мг ($\pm 15\%$), від 1 мг до 10 мг ($\pm 10\%$), від 10 мг до 100 мг ($\pm 7,5\%$) і від 100 мг й вище ($\pm 5\%$).

8.4.6. Супровідні домішки

Випробування проводять методом рідинної хроматографії відповідно до вимог Фармакопеї («Рідинна хроматографія» (2.2.29)).

По 50 мл випробовуваного розчину (близько 0,04 г (точна наважка) вмісту капсули розчиняють у воді і доводять об'єм розчину до 100,0 мл водою і розчину порівняння (1,0 мл випробовуваного розчину доводять до 100,0 мл

водою), поперемінно хроматографують на рідинному хроматографі з УФ-детектором. Час хроматографування випробовуваного розчину має бути в чотири рази більший за час утримування основного піка.

На хроматограмі випробовуваного розчину площа піка домішки А, а також площа піка будь-якої іншої домішки не має перевищувати площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (не більше 1,0 %); сума площ усіх піків, крім основного, не має перевищувати більш ніж у 3,0 рази площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (с) (не більше 3,0 %), не враховуючи піки з площею менше 5 % від площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (0,05 %).

8.4.7. Втрата в масі при висушуванні

Втрата не більше 3,5 %. Визначають ДФУ, вид.1, р.2.2.32, с. 49.

0,1 г сухої розтертої біомаси з флакона сушать в вакуум-сушильній шафі при температурі від 58 до 62 °С і при тиску від 1,5 кПа до 2,5 кПа до постійної маси.

8.4.8. Специфічна нешкідливість

Препарат має бути нешкідливим для білих мишей при введенні його перорального в кількості однієї дози.

Випробування проводять на 5-ти безпородних мишах різної статі масою 14–16 г (зважування проводять безпосередньо перед дослідом).

Вміст капсули розводять водою з розрахунку 0,5 мл на 1 дозу препарату. Кожній з 5-ти мишей вводять 0,5 мл з розведення перорально в шлунок за допомогою насадки на шприц місткістю 1 мл. Термін спостереження – 5 діб.

Всі тварини повинні залишитися живими та не втратити у вазі.

У випадку загибелі за цей період хоча б однієї тварини або втраті у вазі контроль повторюють на подвійній кількості тварин. Препарат вважають нешкідливим, якщо при повторному випробуванні не загинула жодна з мишей. У протилежному випадку дану серію препарату бракують.

8.4.9. Мікробіологічна чистота

Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, пліснявих та дріжджеподібних грибів. Визначають згідно з ДФУ, доп. 1, р. 2.6.12, с.37, р. 2.6.13, N, с. 42.

Зразок лікарського засобу у кількості 10 г поміщають у мірний флакон місткістю 250 мл, доводять до 100 мл (розведення 1:10) буферним розчином з натрієм хлоридом і пептоном, рН 7,0 та перемішують до отримання гомогенної зависі.

Для визначення загальної кількості бактерій по 1 мл зависі висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з густим поживним середовищем №1 методом двошарового висівання.

Для визначення загальної кількості грибів по 1 мл зависі висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з густим поживним середовищем 2 методом двошарового висівання.

Посіви на середовищі №1 інкубують при 30–35 °С для виявлення бактерій, а посіви з середовищем №2 – при 20–25 °С для виявлення грибів протягом 5 діб, якщо вірогідні результати не будуть отримані раніше.

Для визначення окремих видів мікроорганізмів по 10 мл зависі висівають на рідких поживних середовищах: №3 (для виявлення бактерій родини *Enterobacteriaceae*) та №8 (для виявлення *Pseudomonas aureginosa* та *Staphylococcus aureus*). Посіви інкубують при 30–35 °С протягом 18–24 год, після чого роблять пересіви з середовища №3 на густі середовища №4 та №5, а з середовища №8 – на середовища №9 та №10. Посіви інкубують при 35–37 °С протягом 24–48 год. При наявності росту мікроорганізмів проводять їх ідентифікацію згідно вимог ДФУ, доп. 1, р. 2.6.13, N, с.42.

Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, плісняви та дріжджеподібних грибів. У випадку виявлення в посівах сторонніх мікроорганізмів, контроль проводять на подвоєній кількості зразків препарату.

При відсутності росту мікроорганізмів при повторному висіву досліджуваний препарат вважають таким, що відповідає вимогам. У випадку

росту сторонніх мікроорганізмів при повторному висіві зразків серію препарату бракують.

8.4.10 Специфічна активність

Визначення кількості життєздатних лактобацил в 1 дозі препарату

Визначення кількості живих лактобацил в одній дозі препарату проводять на трьох зразках препарату від кожної серії.

Вміст однієї капсули розводять з водою з розрахунку 1 мл на 1 дозу і залишають на 1 год при кімнатній температурі для регідратації біомаси. Далі висівають по 0,1 мл мікробної суспензії на 4 чашки Петрі з середовищем MRS.

Засів чашок проводять наступним чином: перенести 0,1 мл мікробної суспензії у стерильну чашку Петрі і нести 15-20 мл розплавленого поживного середовища з температурою (45 ± 1) °C. Середовище ретельно перемішують з інкулятом та дають суміші затвердіти, залишаючи чашки Петрі на холодній горизонтальній поверхні. Після застигання агаризованого середовища посіви інкубують, поставивши чашки дном догори. Після 44 год інкубації при 37 °C виконують підрахунок вирослих колоній і обчислюють вміст живих бактерій в 1 дозі препарату. В одній дозі препарату (1 капсула) при випуску повинно міститися не менш $2 \cdot 10^9$ живих лактобацил.

Антагоністична активність

Антагоністичну активність пробіотичного препарату визначаємо за допомогою методу агарових блоків [89].

Вміст однієї капсули розводимо водою (1 мл на 1 дозу препарату). Отримане розведення засіваємо газом у товщ агаризованого середовища MRS. Робимо це так: 1 мл мікробної суспензії переносимо у стерильну чашку Петрі, та заливаємо 20 мл розплавленого середовища температурою 45°C. Після перемішування залишаємо чашки на горизонтальній поверхні до моменту затвердіння середовища [89].

Вирощування проводимо в анаеробних умовах при 37°C, 72 год. Далі потрібно вирізати пробійником агаровий блок і розмістити у центрі чашки Петрі з середовищем Гаузе-2. До встановленого блоку радіально підсіваємо

тест-культури патогенних чи умовно-патогенних мікроорганізмів. Інкубуємо за температури 37°C протягом 72 год [89].

Після закінчення часу, оцінюємо зони затримки росту. Якщо зона становить 30-40 мм, то тест-культури високочутливі до нашого пробіотичного мікроорганізму. При 20-30 мм-чутливі, 15-20- помірно чутливі, а якщо зона затримки становить 5-15 мм це означає, що тест-культури малочутливі до антимікробної дії *Lactobacillus fermentum* [89].

Адгезивна активність

При потраплянні у організм хазяїна, молочнокисла бактерія *Lactobacillus fermentum* повинна адгезуватися на стінках епітелію шлунково-кишкового тракту. Тому важливим методом контролю є визначити у бактерії цю здатність.

Визначення здійснюємо експрес-методом. Проводимо розведення (1 мл води для 1 дози препарату). 1 мл отриманої суспензії висіюємо у рідке середовище МРС впродовж 2 діб при 37°C [89].

Субстратом слугують формалізовані еритроцити людини, які попередньо двічі відмиті 0,1 М фосфатним буфером в ізотонічному розчині NaCl (рН 7,2-7,3). Центрифугуємо при 1000 об/хв. Для проведення дослідю суспензія еритроцитів повинна бути концентрацією 10^8 кл/см³ буфера [89].

На предметне скельце наносимо 1 краплину буферного розчину, в якому суспендують по 1 краплині суспензії еритроцитів та мікроорганізму з середовища МРС. Після скельце поміщаємо у вологу камеру (чашку Петрі) на 30 хв при 37°C. Далі препарат сушимо, фіксуємо жаром і фарбуємо метиленовим синім або фуксином [89].

Щоб визначити ступінь адгезії використовуємо світловий мікроскоп. Адгезивні властивості визначаємо за допомогою середнього показника адгезії (СПА). При показнику СПА (0-1,0)-адгезія нульова, (1,01-2,0) – низька, (2,01-4,0)-середня та найкращою вважається висока (понад 4,0) [89].

Гіпохолестеринемічна активність

Перевагою використання пробіотичної бактерії *Lactobacillus fermentum* F6 у препараті «Фарманекс Про-Бі» є їх висока здатність знижувати рівень холестерину в крові. Тому вести контроль готового засобу за цією ознакою є надзвичайно важливо.

Для визначення гіпохолестеринемічної здатності Зазвичай використовують мікрометод прямого визначення вільного та загального холестерину в сироватці крові (за Н. Станкевичене) [89].

Принцип ґрунтується на реакції взаємодії кольорового реактиву з холестерином однієї й тієї самої проби сироватки крові за різних температурних умов [89].

Дослідження потрібно проводити двічі: до пробіотикотерапії та після неї. За різницею рівня сироваткового холестерину роблять висновок про гіпохолестеринемічну активність пробіотичних мікроорганізмів. На першому етапі методу визначають вільний холестерин, на другому — сумарну кількість вільного та зв'язаного холестерину [89].

У пробірку наливають 2 см³ кольорового реактиву (0,1 %-й розчин хлорного заліза — FeCl·6H₂O у льодяній оцтовій кислоті та концентрованій сульфатній кислоті у співвідношенні 3:2). Далі мікропіпеткою обережно наносять на стінку пробірки 0,02 см³ сироватки або плазми крові. Пробірку перемішують та залишають у на 1 год при температурі 20°C [89].

Після вимірюємо оптичну густину за довжини хвилі 560 нм та довжини світлового шляху 5 мм проти кольорового реактиву. Після визначення вільного холестерину дану реакційну використовують для подальшого досліду [89].

Пробірку переносять у киплячу водяну баню і витримують поки вода у бані знову закипить (30-60 с). Пробірку виймають, охолоджують до кімнатної температури та визначають оптичну густину як вищеописано. Розрахунок виконують за формулою:

$$\rho = \frac{E_{\text{вільного (загального) холестерину в пробі}} \cdot 200 \text{ (мг\%)}}{E_{\text{стандарту}}}$$

Визначення активності кислотоутворення

Визначення активності кислотоутворення проводять титриметричним методом. Кожну пробу титрують розчином натрію гідроксиду 0,1 моль/л у присутності індикатора фенолфталеїну до появи слабо-рожевого кольору. Показник активності кислотоутворення Фарманекс Про-Бі, виражений у градусах Тернера (TE), повинен бути не менш 200. Роблять посів 0,1 мл розведеного препарату в пробірку з 9 мл рідкого поживного середовища MRS. Визначають вихідне значення кислотності поживного середовища титриметрично.

Умови зберігання. Продукт варто зберігати при температурі не більше 20 °С, подалі від джерела тепла, сонячного світла і високої вологості.

Термін придатності препарату пробіотика Фарманекс Про-Бі – 18 місяців [12, 145].

РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

У даному проєкті було обрано для розроблення схеми автоматизації ділянку ліофільної сушарки, яка складається з збірника (в якому змішується желатин, сахароза, сухе знежирене молоко з біомасою молочнокислих бактерій *Lactobacillus fermentum* F6) та самої сушарки, в якій відбувається висушування молочнокислих бактерій для подальшого виготовлення пробіотичного препарату «Фарманекс Про-Бі» (рис.9.1).

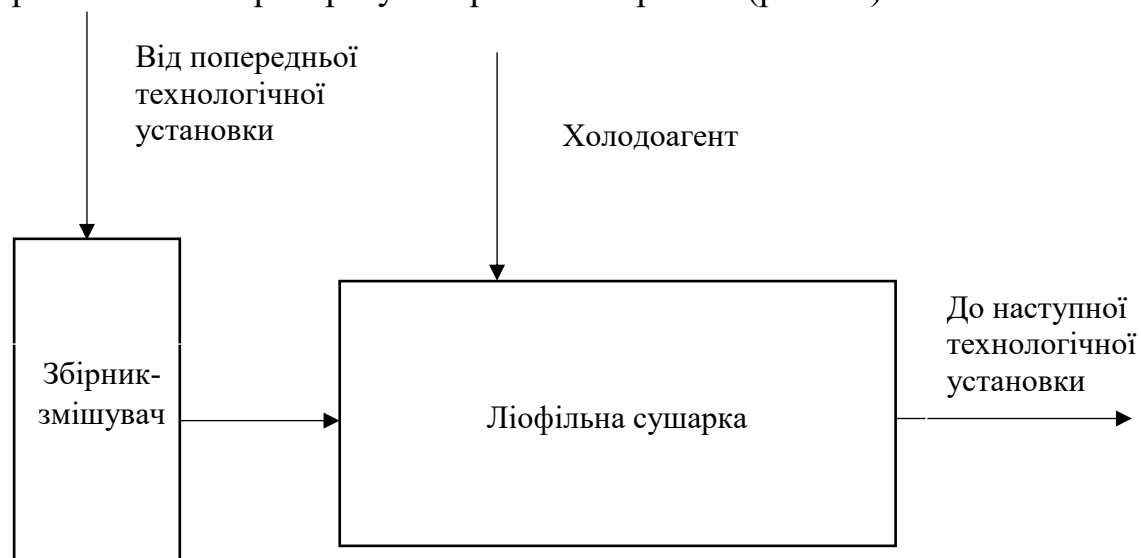


Рис.9.1 Машино-апаратна схема технологічного процесу

В результаті аналізу технологічного процесу зроблені висновки, що автоматизація повинна забезпечувати:

1. Контроль і регулювання за рівнем рідини у збірнику-змішувачі з сигналізацією досягнення верхнього припустимого рівня у 70 % і управління клапаном подачі рідини у збірник
2. Контроль інтенсивності перемішування у збірнику-змішувачі і управління дистанційно шляхом запуску чи зупинкою двигуна
3. Контроль і регулювання температури заморожування та сушіння у ліофільній сушарці шляхом впливу на подачу холодоагента.

					НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Максимець О.О.			РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Грегорчак Н.М.					114	142
Консультант		Клименко О.М.				Кафедра БТМ ¹¹⁶		
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

4. Контроль тиску в ліофільній сушарці по місцю.

Відповідно до переліку розглянутих задач системи керування заповнюємо табл. 9.2. При цьому будемо притримуватись рішення, що у роботі буде розглянута система автоматизації у якій центральним управляючим пристроєм є мікропроцесорний контролер, а спостереження за ходом виконання технологічним процесом і у разі необхідності втручання в управління ним буде відбуватись за допомогою автоматизованого робочого місця (АРМ) оператора технолога з використанням спеціально розробленого людино-машинного інтерфейсу.

Таблиця 9.2

№ з. п	Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Припустиме значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю чи управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
1	Збірник-змішувач із захисним середовищем	Рівень рідини в апараті	70% ± 2 °С	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
				Регулювання	Захист від переповнення збірника	Вплив на подачу рідини у збірник
2	Збірник-змішувач із захисним середовищем	Інтенсивність перемішування	40 об/хв ± 10 об/хв	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Управління	Дистанційне	Пуск/Стоп двигуна
3	Ліофільна сушарка	Температура заморожування, сушіння	-50,3 °С ± 0,9 °С	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату холодоагенту
4	Ліофільна сушарка	Тиск (вакуум в апараті)	0,01-0,03 атм.	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора

9.1. Опис функціональної схеми автоматизації з специфікацією засобів автоматизації

У першому контурі автоматичного контролю і управління у збірнику необхідно контролювати рівень рідини, який має регламентоване значення 70% і має припустимі межі $\pm 2\%$. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога. Сигналізація про досягнення верхнього рівня передбачається на АРМі оператора-технолога. При цьому сам датчик встановлюється «по місцю».

Для регулювання рідини в апараті здійснюється впливом на подачу рідини в апарат, який змінюється пневматичним виконавчим механізмом.

У другому контурі автоматичного контролю і управління у збірнику необхідно контролювати і управляти швидкістю перемішування, яка має регламентоване значення 40 об/хв з припустимими межами ± 10 об/хв. Спостереження за зміною ведеться на АРМі оператора технолога з реєстрацією в архів. Управління здійснюється дистанційно за рахунок пуск/стоп двигуна. Датчик розташований по місцю.

У третьому контурі автоматичного контролю і управління у ліофільній сушарці необхідно контролювати температуру, яка має регламентоване значення ($-50,3$ °С) з припустимими межами $\pm 0,9$ °С. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора з реєстрацією змін в його архіві.

Для регулювання температури передбачається її стабілізація на заданому значенні за рахунок зміни витрати холодоагента, яка змінюється пневматичним виконавчим механізмом.

Вимірювання температури всередині сушарки відбувається безперервно в часі в певному діапазоні, тому необхідно розглядати приклади контролю в яких від датчика отримується аналоговий (неперервний) сигнал. При цьому сам датчик розташований «по місцю».

У четвертому контурі автоматичного контролю і управління необхідно контролювати тиск в апараті, який має значення 0,01-0,03 атм.

Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога з реєстрацією змін в його архіві.

Вимірювання тиску відбувається безперервно в часі в певному діапазоні, тому необхідно розглядати приклади контролю в яких від датчика отримується аналоговий (неперервний) сигнал. При цьому сам датчик розташований «по місцю».

На даному виробництві правильним рішенням буде застосовувати засоби автоматизації, похибка яких є не більше 1%, та яким властива надійність у роботі [146].

Специфікація на засоби автоматизації

№ п/п	№ позиції за схемою	Найменування і технічна характеристика виробу	Тип, марка	Виробник
1	2	3	4	5
1	1а	Ємнісний датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 265-4000мм, максимальна допустима температура +125 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 10бар, під'єднання G5/4, аналоговий вихід, точність 2мм	NMC	Kobold
	1б	Електропневматичний перетворювач, вхідний сигнал 4...20мА, вихідний сигнал 20...100кПа	2713-WP	Dwyer
	1в	Мембранний виконавчий механізм прямої дії з пневматичним позиціонером, управляючий сигнал 20...100кПа, умовний хід вихідного елемента 25мм	МИМ200-113	ГідроЕнерго-Снаб
2	2а	<p style="text-align: center;">Частотний перетворювач</p> Altivar Process (ATV600), для асинхронних та синхронних двигунів Напруга 200/240 В – от 7,5 до 22 кВт , Розширений діапазон THDi 48% от 100% до 80% номінального навантаження двигуна	ATV 630	Altivar 600

Закінчення табл. 9.3

3	3а	Термометр опору, матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, градувальна характеристика Pt100, діапазон вимірювань: -80...+600 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 25бар, приєднання G1/2	1-3, ТСП(Pt100)	ПАО „Тера”, Україна
	3б	Електропневматичний перетворювач, вхідний сигнал 4...20мА, вихідний сигнал 20...100кПа	2713-WP	Dwyer
	3в	Мембранний виконавчий механізм прямої дії з пневматичним позиціонером, управляючий сигнал 20...100кПа, умовний хід вихідного елемента 25мм	МИМ200-113	ГідроЕнерго-Снаб
4	4а	Деформаційний манометр з одновитковою трубчатою пружиною, матеріал виготовлення латунь, діапазон вимірювань 0...16бар, під'єднання G1/4, клас точності 1,6	ДМ 05100 (М)	ПАО „Склоприбор”, Україна

РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

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

Технологія одержання біомаси *Lactobacillus fermentum* для пробіотичного препарату «Фарманекс Про-Бі» включає доферментаційні допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, приготування і стерилізація розчину для титрування, приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу біомаси) та ферментаційні технологічні процеси (одержання посівного матеріалу, біосинтез біомаси *Lactobacillus fermentum*) та післяферментаційні технологічні процеси (центрифугування, ліофільне сушіння, подрібнення, просіювання), стадії пакування, маркування та відвантаження.

Місцями емісії рідких відходів виробництва є:

- Санітарна підготовка виробництва. Щоденне та генеральне миття приміщень, миття та ополіскування обладнання розчинами миючих та дезінфікуючих засобів. Розчини знезаражуються після використання.
- Центрифугування. Рідкі відходи даного етапу- відділена культуральна рідина.

Тверді відходи виробництва простежуються під час виконання таких операцій як:

- Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу і виробничого біосинтезу. Перед початком виробничого біосинтезу компоненти ПС зберігаються у пакувальних тарах чи спеціальних ємностях. Після використання ПС потрібно утилізувати чи переробляти тверді відходи у вигляді пакувальної тари.

					НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Максимець О.О			РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля	Літ.	Арк.	Акруїів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					120	142
Консультант								122
Н.Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

- Санітарна підготовка виробництва. Миючі та дезінфікуючі засоби зберігаються у спеціальних ємностях, які після використання необхідно знешкоджувати.

- Пакування, маркування та відвантаження. Під час пакування, можливий брак готового продукту.

Місцями емісії газоповітряних відходів є:

- Підготовка посівного матеріалу. На цьому етапі отримують і масштабують посівний матеріал у колбах в термостаті та посівному апараті. Варто зауважити, що *Lactobacillus fermentum* має найкращий вихід рівня біомаси у мікроаерофільних умовах. Тому під час культивування буде виникати відпрацьоване повітря.

- Перевірка обладнання на герметичність.

- Виробничий біосинтез. Цей етап передбачає отримання біомаси молочнокислих бактерій. При культивуванні є місце викиду в атмосферу газоповітряних відходів.

- Етапи виділення. Порошкоподібні газові відходи після етапів подрібнення та просіювання.

10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Представлена технологічна схема (рис.10.1) установки знезараження і регенерації відпрацьованого миючого розчину призначена для очищення технологічних розчинів від диспергованих домішок масла, зважених частинок речовин, розчинених домішок, що утворюються на ділянці мийки обладнання. Забруднений технологічний розчин насосом 3 перекачується в електрореактор. Електроди 10 з'єднані з джерелом постійного струму 8 і виробляють коагулянт і газ. Взаємодія домішок коагулянту і газу, їх інтенсифікація, відбувається в конусних пристроях установки, де вони відокремлюються у вигляді флотошлему. Видалення домішок, що спливають з електрореактора флотатора, проводиться ежекторним пристроєм 12, який працює з використанням стисненого повітря. Додаткова обробка

відпрацьованого миючого розчину в міжелектродному просторі електродів вторинної доочистки дозволяє отримати домішки більших розмірів і поліпшити ефективність їх осадження в циліндричному корпусі установки [147].

Частина очищеного миючого розчину повертається в ємність електроліту 5, через засувку 20. Осад періодично скидають до збірнику шламу 6, а масло і насичений розчин флотошламу в збірник масла 7 [147].

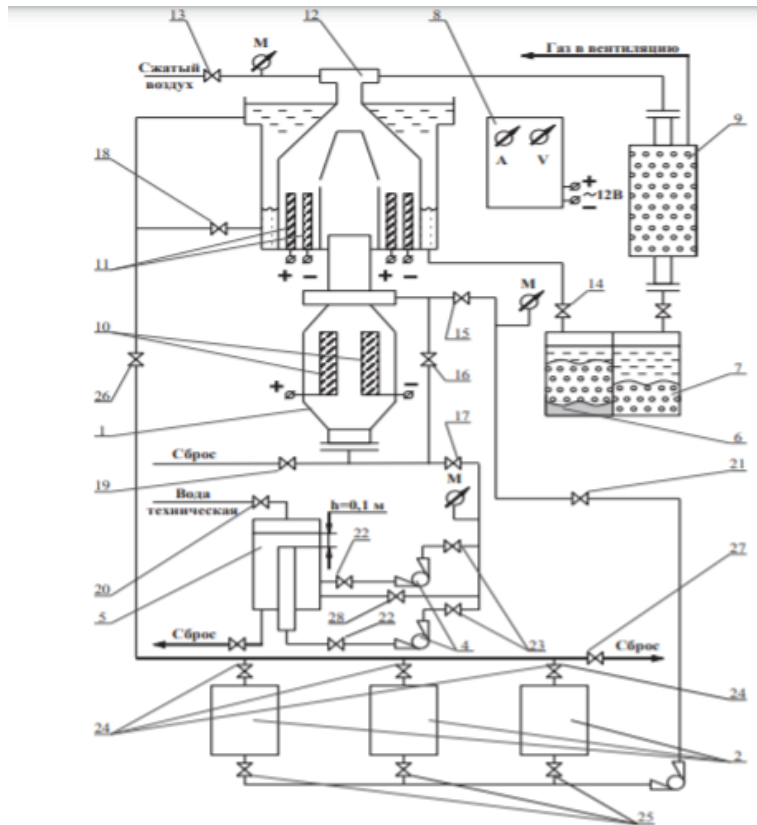


Рис. 10.1. Технологічна схема знезараження і регенерації відпрацьованого миючого розчину ВМЗ: 1 - мікрореактор-флотатор; 2 -миючі розчини, 3 - насос подачі; 4 - насос подачі електроліту; 5 - збірник електроліту; 6 - збірник шламу; 7 - збірник масла; 8 - випрямний пристрій; 9 - сепаратор шламу; 10 - нержинні сталеві електроди; 11 - електроди вторинної доочистки; 12 - ежекторний пристрій.

Біологічний фільтр - резервуар, в якому стоки фільтруються через завантажувальний матеріал, покритий біологічною плівкою, яка складається з колоній мікроорганізмів.

Мікрофлора, що мешкає в біоплівці, розкладає органічні речовини, застосовуючи їх як джерело живлення і отримання енергії. Видовий склад, з якого складається біоплівка різноманітний. Це підвищує ефективність і стабільність очищення стічних вод. Як завантаження використовуються матеріали з високою пористістю, малою щільністю, високою питомою поверхнею (щебінь, гравій, шлак, керамзит, метал і пластикові сітки) [148].

Особливістю біофільтрів високого навантаження (рис.10.2) є висока окислювальна потужність. Обумовлюється вона незамулюванням таких фільтрів і кращим обміном повітря в них. Досягається це завдяки більшому завантажувальному матеріалу і підвищеній в декілька разів навантаженні по воді. Враховується, що у процесі очищення супернатанту у біофільтр потрапить молочнокисла бактерія *L.fermentum*, яка може залишитися у біофільтрі і не брати активної участі у процесі очищення [149].

Подальше збільшення швидкості руху стічної води у біофільтрі забезпечує постійний винос з нього затриманих важкоокислюючих нерозчинених домішок і біоплівки, що відмерла. Винесені з високо навантажених біофільтрів домішки затримуються у вторинних відстійниках [149].

Розподіл стічної води по поверхні біофільтрів здійснюється нерухомими розбризкувачами або рухомими реактивними зрошувачами. Найбільшого поширення з нерухомих розбризкувачів отримали назву спринклерні установки. Спринклерна система складається з дозуючого бака, мережі, що розводить і спринклерів. Спринклери (спринклерні головки) спеціальні насадки, надіті на кінці стояків, які відгалужуються від водорозподільних труб, покладених на поверхні або в самому біофільтрі. Отвори спринклерних головок невеликі зазвичай 19, 22 і 25 мм. Щоб уникнути корозії спринклери виготовляють з бронзи або латуні. Для нормальної роботи біофільтра необхідна подача повітря в достатній кількості. У високо навантажених біофільтрах повітря подається вентиляторами в простір між дренажем і днищем [150].

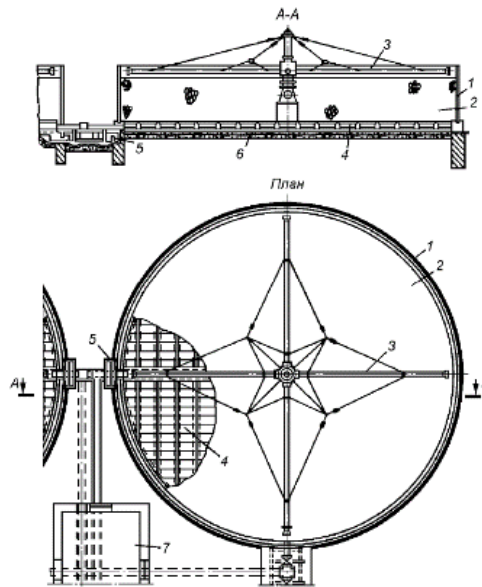


Рис. 10.2. Високонвантажуваний біофільтр

1—корпус; 2—завантаження; 3—реактивний зрошувач; 4—дренаж; 5—гідрозатвор; 6—суцільне дно; 7—вентиляційна камера

10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Переробка відходів поліпропілену і полікарбонату з отриманням наносорбційних матеріалів проводять методом піролізу при температурі 550 °С протягом 30 хв, з наступною активацією отриманих карбоніатів в середовищі вуглекислого газу при температурі 900 °С [151].

При деструкції поліпропілену і полікарбонату при температурі 500 °С утворюються конденсовані і неконденсовані піролізні гази. Рідка фракція має високу теплотворну здатність (35000-40000 кДж/кг) і після додаткової обробки може бути використана в якості рідкого палива подібного мазуті. Неконденсовані гази також володіють теплотворною здатністю і можуть бути використані для обігріву печі піролізу [152].

Для отримання АВ, карбонізати були активовані в обертовій печі з зовнішнім електрообігрівом при температурі 900 °С в середовищі діоксиду вуглецю [152].

На виході отримуємо зразки АВ, які за основними технічними та сорбційними характеристиками можна порівняти з відомими промисловими марками АУ: БАУ-А (ГОСТ 6217) і ОУ-А (порошкоподібне освітлююче

вугілля ГОСТ 4453) і КАУ-1, що можуть бути використані в системах водоочищення. Особливістю АВ на основі полімерних відходів є їх низька зольність. На рисунках 10.3 та 10.4 зображені схеми піролізу поліпропілену та полікарбонату [152].

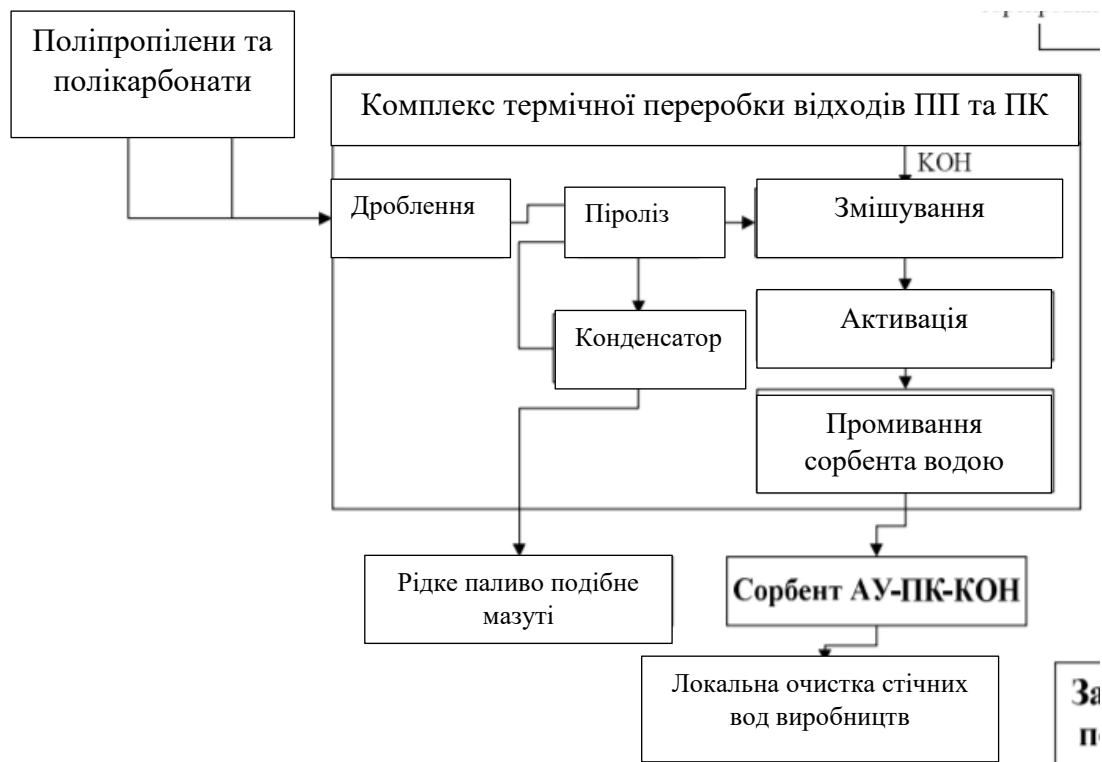


Рис. 10.3. Система управління відходами ПП та ПК

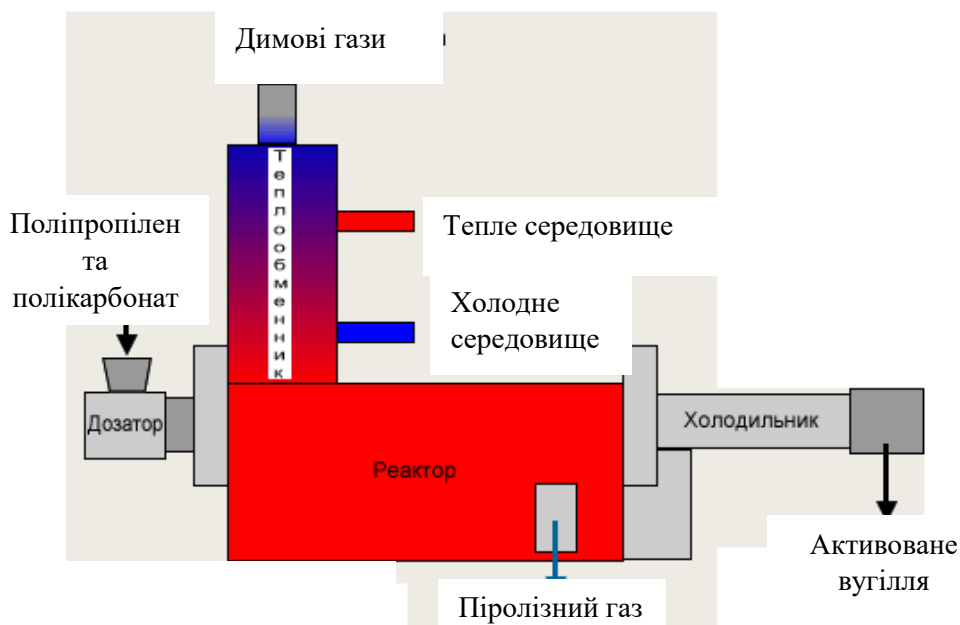


Рис. 10.4. Схема піролізу поліпропілену [153]

10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

В абсорбер (рис. 10.5) через патрубок 1 надходить загазоване повітря з максимальним парціальним тиском, барботує через шар рідини 5 (у вигляді бульбашок) і виходить через патрубок 3 з мінімальним парціальним тиском. Рідина протитечією надходить в апарат через розбризкувач 4 і виходить через патрубок 7 [154].

Процес абсорбції є гетерогенним, що протікає на межі "газ — рідина", тому для його прискорення застосовують різні пристрої, що збільшують площу контакту газу з рідиною. Для підвищення ефективності очищення повітря від пари розчинників, розріджувачів і газів застосовують хімічні поглиначі у вигляді водних розчинів електролітів (кислот, солей, лугів тощо). Рідина, що виводиться із абсорбера, підлягає регенерації, десорбуючи забруднювальну речовину, і повертається знову в процес (або відводиться як відходи) [154].



Рис. 10.5. Схема башти-абсорбера: 1 — вхідний патрубок для загазованого повітря; 2 — патрубок для подавання рідини; 3 — вихідний патрубок для відведення очищеного повітря; 4 — розбризкувач; 5 — шар рідини з насадкою; 6 — сітка; 7 — вихідний патрубок для відведення забрудненої

ВОДИ

10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Для зменшення об'єму відпрацьованих миючих розчинів пропонуємо знезаражувати і регенерувати мийні розчини після миття обладнання та використовувати їх повторно. Виконання поставленої мети досягається шляхом використання в технологічній схемі обладнання декількох ступенів очищення, що виконують операції кожна самостійно і всі разом і підвищення ступеня очищення стічних вод на апаратах вертикального типу, за рахунок використання електрохімічних компонентів, що містяться у відпрацьованих миючих розчинах [147].

Заходи для зменшення об'ємів твердих відходів. За допомогою піролізу полімерних матеріалів отримують пористий вуглецевий сорбент- активоване вугілля, яке знаходить широке застосування в практиці очищення газових викидів, стічних вод, під час водопідготовки, є носіями каталізаторів і ін.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Янковский Д.С., Ширококов В.П., Димент Г.С. Иновационные технологии оздоровления микробиому людини. *Nauka innov.* 2018, 14 (6): 11-23.
2. Berkes E., Liao Y.H., Neef D., Grandalski M., Monsul N. Potentiated in vitro probiotic activities of *Lactobacillus fermentum* LfQi6 biofilm biomass versus planktonic culture. *Prob. and Antimic. Prot.* 2019, 1-18.
3. Леонова М.В. Пробиотики в лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта: эффективность с позиции доказательной медицины. *Cons.Med.* 2020, 22 (8): 57–64. doi.org/10.26442/20751753.2020.8.200195
4. Андреева И. В. Эффективность пробиотиков при инфекциях желудочно-кишечного тракта. *Gastroenterology.* 2015, 12 (113): 34-41.
5. Новокшенов А.А., Соколова Н.В. Физиологические функции лактобактерий в организме и эффективность их применения в составе пробиотиков в педиатрической практике. *Эффект. Фарм. Эпидем. и инфек.* 2018, 2(54).
6. Xingchang Zh., Xia Ch., Qi Zh. Study on the optimization of enrichment medium of *Lactobacillus fermentum* F6 and its high-density cultivation. *J. of Dairy Sci. and Techn.* 2010, 3(142): 101-107. doi:10.15922/j.cnki.jdst.2010.03.009
7. Sun J, Buys N. Effects of probiotics consumption on lowering lipids and CVD risk factors: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of medicine.* 2015, 18;47(6):430-40.
8. Wilkins T., Sequoia J. Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. *Am. Fam. Physician.* 2017, 96(3): 170-178.
9. Crow J.R., Davis S.L., Chaykosky D.M. et al. Probiotics and Fecal Microbiota Transplant for Primary and Secondary Prevention of Clostridium difficile Infection. *Pharmacotherapy.* 2015, 35(11): 1016-1025.

					НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Список використаної літератури					
Розроб.		Максимець О.О.						Літ.	Арк.	Акруїив
Перевір.		Грегірчак Н.М.							128	144
Консультант								130		
Н.Контр.								Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.								

10. Dronkers T.M.G., Krist L., Van Overveld F.J., Rijkers G.T. The ascent of the blessed: Regulatory issues on health effects and health claims for probiotics in Europe and the rest of the world. *Benef. Microbes*. 2018, 9(5):717-723.
11. Оніщенко Б.О., Зоценко В.М. Нормалізація мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту пробіотиками. *Акт. пробл. ветеринар. мед.: матеріали наук. практ. конф. студ.* 2019, 127-130.
12. <https://www.vidal.ru/drugs/pharmanex-pro-b#dosage> VIDAL. Фарманекс Про-Би (Pharmanex® Pro-B™) інструкція по применению.
13. <https://medum.ru/farmaneks-probi-kapsuly> MEDUM. Фарманекс Про-Би, капсулы.
14. https://www.lsgeotar.ru/farmanex-bi-22155.html#lek_form ЛС ГЭОТАР. Фарманекс Про-Би (Pharmanex-Pro B).
15. Зайков С.В. Імунотропні властивості пробіотиків, вітамінів та мікроелементів. *Кл. імун. Алер. Інфект.* 2015, 3–4 (82–83): 21-28.
16. <http://lactovit-forte.com.ua/>. Опис Лактовіт Форте.
17. <https://symbiter.ua/uk/multiprobiotics-apibact-ua>. Мультипробіотики Апібакт. О.Д. Пролісок.
18. http://old.medexpert.org.ua/modules/myarticles/article_storyid_326.html. Использование пробиотиков с целью улучшения репродуктивного здоровья женщины.
19. <https://viridis.ua/uk/product/probiz-femina-kaps-30.20843/instruction/>. Інструкція до «Пробіз феміна» капс. №30. Viridis Pharmaceutical.
20. <https://symbiter.ua/uk/multiprobiotics-symbiter-ua/symbiter-forte-with-propolis-ua.html>. Пробіотики Симбітер форте. О.Д. Пролісок.
21. Соловьева И.В., Точилина А.Г. Биологические свойства лактобацилл. Перспективы использования в лабораториях Роспотребнадзора экспрессметодов амплификации нуклеиновых кислот при контроле качества пищевых продуктов, БАД к пище, лекарственных форм,

содержащих лактобациллы (аналитический обзор). *Медиаль*, 2014, 2(12): 29-44.

22. Волосянко О.В., Ушкалов В.О. Бактерії роду *Lactobacillus* у харчовій промисловості (огляд). *Ветер. мед., як. і безп. продук. тварин*. 2018, 6(76): 1-8. doi.org/10.31548/dopovidi2018.06.023

23. Яруллина Д.Р. Бактерии рода *Lactobacillus*: общая характеристика и методы работы с ними: учеб.-метод. пособие / Д.Р. Яруллина, Р.Ф. Фахруллин. –К. :Казанский университет, 2014. – 51 с.

24. Karthik M., Bhavan P.S., Muralisankar Th. Dietary supplementation of *Lactobacillus fermentum* for improving the survival, growth and nutritional profiles of the prawn macrobrachium rosenbergii, and 16S rDNA based identification of its establishment. *ScholReps*. 2018, 1(3): 38-62

25. Красникова Л.В. Микробиология молока и молочных продуктов: лаб. практикум: / Л.В. Красникова, П.И. Гунькова, В.В Маркелова. – СПб. :НИУ ИТМО, 2013. – 85 с.

26. <https://www.genome.jp/entry/T02669> GENOME: *Lactobacillus fermentum* F-6.

27. <https://tkoz.sumy.ua/zahvorjuvannja-organiv-travnoi-sistemi/> «Оздоровчий». Захворювання органів травної системи.

28. Адамович І. В., Вовк К. В., Літвін О. І. Аналіз захворюваності хвороб органів травлення в студентській популяції та профілактичні заходи їх подолання. *Клін. та профілакт. мед.* 2018, 3 (63): 5-8.

29. Рингач Н.О., Керецман А.О. Хвороби органів травлення: історичні паралелі змін класифікації та епідеміологічної ситуації. *Гастроентерология. Сем. мед.* 2015, 4 (60): 137-141.

30. Проданчук М.Г., Подрушняк А.Є. Проблеми безпечності біологічно активних добавок. *Проб. харч.* 2004. - №2. С. 2; 4-9.

31. Лапшин О.В., Одинець М.О. Кишкова мікрофлора: вплив на здоров'я людини. *Ліки України. Кардіоневрологія.* 2014, (7–8): 183–184.

32. Волосянко О. В., Ушкалов В. О. Терещенко С. А. Біологічні властивості лактобацил. Огляд. *Національний університет біоресурсів і природокористування України* 2018, 119-127.
33. Naghmouchi K., Belguesmia Yan., Bendali F., Spano G. *Lactobacillus fermentum*: a bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications. *Crit. Rev. in F. Sci. and Nutr.* 2019, 1-13.
34. <https://humarian.com/l-fermentum/> *L. fermentum* – A common probiotic strain.
35. <https://www.gastroscan.ru/handbook/118/1906> Функціональна гастроентерологія. *Lactobacillus* (лактобактерії або лактобацили, род бактерій).
36. <https://www.apteka.ua/article/470569> Перелік лікарських засобів, дозволених до застосування, які відпускаються без рецептів з аптек та їх структурних підрозділів.
37. <https://www.apteka.ua/article/506131> Перелік лікарських засобів, дозволених до застосування, які відпускаються без рецептів з аптек та їх структурних підрозділів (Ф).
38. Радченко О.М. Ведення хворих на хронічний ентерит та абдомінальний ішемічний синдром. *Рац. фармакотерап.* 2011, 1 (18): 72-76.
39. Макаренко О.М., Петров П.І., Лугіна С.В. Сучасний погляд на проблему профілактики та лікування дисбактеріозу. *Акт. проб. суч. мед.* 2016, 16, 2 (54): 294-300.
40. <http://amnu.gov.ua/syndrom-podraznenogo-kyshechnyka/> Національна академія медичних наук України. Синдром подразненого кишечника.
41. Рюмина И.И., Левадная А.В., Зубков В.В. Лактостаз и профилактика лактационного мастита: роль неонатолога и педиатра. *Мед. совет.* 2020, (1):170-175. doi: 10.21518/2079-701X-2020-1-170-175.
42. https://www.rlsnet.ru/baa_tn_id_96978.htm Лактанза® Hereditum (LACTANZA® HEREDITUM).

43. <http://jak.bono.odessa.ua/articles/zastosuvannja-lizatov-v-kosmetologii-vektor.php> Застосування лізатів в косметології, вектор-БіАльгам.
44. Державна служба статистики України. Заклади охорони здоров'я та захворюваність населення України у 2017 році. Статистичний збірник. Київ 2018.
45. <https://pro-consulting.ua/issledovanie-rynka/Analiz-rynka-BADov-v-Ukraine-2020-god> Pro-consulting. Аналіз ринка БАДов в Україні. 2020 год.
46. <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html> Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)
47. https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?lff00500 Starch and sucrose metabolism-Lactobacillus fermentum F-6.
48. <https://www.genome.jp/pathway/lff00010> Glycolysis Gluconeogenesis-Lactobacillus fermentum F-6.
49. <https://www.genome.jp/pathway/lff00030> Pentose phosphate pathway-Lactobacillus fermentum F-6.
50. Гужвинська С.О., Палій А.П. Розробка середовища для культивування лактобактерій. Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». Харків. 2017, 224-227 с.
51. Патент Росії на винахід №2528862. Штамм *Lactobacillus fermentum*, що володіє широким спектром антагоністическої активності і пробіотический консорціум лактобактерій для виготовлення бактеріальних препаратів / Абрамов В.М., Хлебников В.С., Пчелинцев С.Ю. Опубл. 20.09.2014, Бюл. №26.
52. Акулевич О.В., Рябінська Л.Б., Дуган О.М. Кінетика росту молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* на живильних середовищах з різноманітними джерелами вуглецевого й азотного живлення. *Проб. біо. та біотех.* 2013, 3(1): 7-11.
53. Філімоненко О.Ю. Загальна біотехнологія: консп. лекцій / О.Ю. Філімоненко. –Д. :ДДТУ, 2016. – 157 с.

54. Хижняк О.С. Розробка складу та біотехнології отримання комплексного пробіотичного препарату: дис. на здоб. наук. ступ. канд. фарм. наук. Харків, 2016. – 204 с.
55. Данилов І.П. Апарати мікробіологічної промисловості : навч. посібник / І.П. Данилов, С.І. Самійленко. – Х. :НТУ «ХП», 2008. – 272 с.
56. ТОВАЖНЯНСЬКИЙ Л.А. Расчеты по технологии органических веществ: учебн. пособие / Л.А. ТОВАЖНЯНСЬКИЙ, В.Г. Новиков, С.И. Бухкало.– Х. :НТУ «ХП», 2006. – 84 с.
57. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2766/anaerobi>
Фармацевтична енциклопедія. Анаероби.
58. <http://www.envirco.in.ua/filterklass.html> Envirco. Таблица класифікації повітряних фільтрів.
59. https://7vz.com/ua/category/ochistka_vozdukha_v_farmatsevticheskoy_promyshlennosti/ Очищення повітря у фармацевтичній промисловості.
60. <https://ventbazar.ua/filtr-kassetnyi-aerostar-sfb-40-20.html> Фильтр кассетный Aerostar SFB 40-20
61. <https://ventbazar.ua/filtr-vozdushnyi-vents-fbk-700kh400-7.html>
Фильтр воздушный ВЕНТС ФБК 700X400-7.
62. <https://pobut.lviv.ua/articles/princip-roboti-hepa-f> Принцип роботи НЕРА-фільтрів.
63. <http://www.cnhepa.com/cardboard-separator-hepa-filter-p53.html>
Картонний сепаратор НЕРА-фільтр.
64. Черепанський В.В., Грегірчак Н.М. Особливості технологічного процесу виробництва пробіотичного препарату на основі лактобацил. *Scientific Works of NUFT* 2020, 26 (3): 45-59.
65. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 Лікарські засоби. Належна виробнича практика.
66. Основи біотехнології: підручник для студ. освітнього рівня бакалавр спец. «Біологія» / уклад. Н.Ю. Мацай.-Луганськ : Держ. закл.

«Луган.нац. ун-т імені Тараса Шевченка».-Луганськ : Вид-во ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка», 2011.-153 с.

67. Конспект лекцій з дисципліни «Дослідження процесів експлуатації мийних розчинів в умовах автотранспортних підприємств» освітньо наукової програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 274 Автомобільний транспорт / Укл.: к.т.н., доц. Авер'янов В.С., Кам'янське, ДДТУ, 2016 р. – 83 с.

68. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник/ М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. - 252 с.

69. Горячий Н.В. Технологии мембранной фильтрации технологических растворов и сред. Отделение биомассы микроорганизмов. *Актуализация* 2014.- 3 с.

70. https://mida.ru/articles/articles_03.php Промышленное технологическое оборудование. Промышленные фильтрующие центрифуги.

71. Методичні вказівки щодо виконання практичних робіт з навчальної дисципліни «Управління якістю та безпека біотехнологічної продукції»/ О.В. Новохатько, О.В. Мазницька.- Кременчук., 2019.- 31 с.

72. Красникова Л.В., Гунькова П.И., Маркелова В.В. Микробиология молока и молочных продуктов: Лабораторный практикум: Учеб.-метод. Пособие. СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. 85 с.

73. Дмитрова М., Хрусавов Д., Динков Н. Качественные показатели хлебопекарных дрожжей из хмеля и изменения в микрофлоре при их хранении. *Известия вузов. Пищевая технология*, 1999, №4: 16-17 с.

74. Gueimonde M., Sanchez B. Enhancing probiotic stability in industrial processes. *Microb EcolHealth Dis.* 2012. № 23. P. 1—5.

75. Savedbowom W., Kerdwan N., Sakom A., et al. Role of protective agents on the viability of probiotic *Lactobacillus plantarum* during freeze drying and subsequent storage. *Int F research J.* 2017. Vol. 24, N. 2. P. 787—794.

76. Jalali M., Abedi D., Varshosaz J., et al. Stability evaluation of freeze-dried *Lactobacillus paracasei subsp.* tolerance and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* in oral capsules. *Res Pharm Sci.* 2012. Vol. 7, N. 1. P. 31—36.

77. <http://propionix.ru/probioticheskaya-produkciya> Краткая информация о биотехнологических продуктах и достижениях.

78. <http://propionix.ru/vyzhivaemost-probioticheskikh-bakterij-pri-razlichnyh-vidah-konservirovaniya> Выживаемость пробиотических бактерий при различных видах консервирования.

79. <https://ukrshealth.ru/rizne/materiali-dlja-likariv/15634-susharki-v-biotehnologichnoi-promislovosti.html> Сушарки в біотехнологічній промисловості.

80. Romano A., Blaiotta G., Di Cerbo A., et al. Spray-dried chestnut extract containing *Lactobacillus rhamnosus* cells as novel ingredient for a probiotic chestnut mousse. *J. Appl. Microbiol.* 2014. Vol. 116. P. 1632—1641.

81. Технологии и оборудование для сушки растительного сырья [Электронный ресурс]: учеб. пособие / В.Н. Тепляшин, Л.И. Ченцова, В.Н. Невзоров; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2019. – 173 с.

82. Hongpattarakere T., Uraipan S. Bifidogenic characteristic and protective effect of saba starch on survival of *Lactobacillus plantarum* CIF17AN2 during vacuum-drying and storage. *Carbohydr. Polym.* 2015. Vol. 117. P. 255—261.

83. Пойманов В.В., Ященко С.М., Барыкин Р.А. Исследование процесса вакуум сублимационной сушки бактериальных концентратов для мясной отрасли с использованием криозамораживания // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. - 2016. - № 1. - С. 25-30.

84. Das S., Bhattacharjee D., Manna A., Basu S. et al. Effect of different excipients and packaging materials on commercial preparation of probiotic formulation. *IJPSR.* 2014. Vol. 5, N. 5. P. 1830—1836.

85. Основні процеси, машини та апарати хімічних виробництв: Підручник / І. В. Коваленко, В. В. Малиновський. — К.: Інрес : Воля, 2005. — 264 с.: іл. — Бібліогр.: с. 253—255.

86. Конспект лекцій до розділу «Механічні процеси» з курсу —Процеси та апарати хімічних виробництв» для студентів III-IV курсів механічних спеціальностей / Укл. С.О. Опарін. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2012. – 112 с.

87. <https://arjes.com.ua/osoblyvosti-zastosuvannia-molotkovo-drobarky/> Особливості застосування молоткової дробарки.

88. <https://buklib.net/books/36208/> Технологія лікарських препаратів промислового виробництва. Просіювання.

89. Технологія пробіотиків: Підруч. / С.О. Старовойтова, О.І. Скроцька, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог.- К.: НУХТ, 2012.- 318 с.

90. Алейник С.Л., Полова Ж.М. Вимоги до якості супозиторіїв як лікарської форми відповідно до світових фармакопей. *Pharmaceutical review*. 2019. № 3. Р. 123-130.

91. <https://www.032.ua/list/235052> Что такое капсулирование-особенности производства.

92. <https://www.minipress.ru/pharma/ukrainian/pharmaceutical-production-technologies/production-of-solid-gelatin-capsules/> Виробництво твердих желатинових капсул.

93. Кондратюк Р.В. Автомати для наповнення твердих желатинових капсул. Національний технічний університет України «Київський політехнічний»

94. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3558/klasifikaciya-virobnichix-primishhen> Фармацевтична енциклопедія. Класифікація виробничих приміщень.

95. Чорний М. В. Система підготовки повітря для медичних та фармацевтичних підприємств. Вінницький національний технічний університет. 2018.

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

97. <https://filters.ru/catalog/karmannye-vozdushnye-filtry/filtr-vozdushnyy-karmannyu-gruboy-ochistki-s-filtrovalnym-materialom-iz-poliestra-fvk/> Фильтр воздушный карманный-ФВК- грубой очистки с фильтровальным материалом из полиэстра.

98. http://www.luxfilter.ru/bagfilter_F5_F6_F7_F8.html Фильтры, фильтрующий материал для вентиляции.

99. <https://pobut.lviv.ua/articles/princip-roboti-hepa-f> Принцип роботи НЕРА-фільтрів.

100. СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013 Лікарські засоби. Якість води для застосування у фармації.

101. EudraLex. — The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. — Volume 4. EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use.

102. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2011. — Лікарські засоби. Належна виробнича практика / М. Ляпунов, О. Безугла, О. Соловійов та ін. — Київ, МОЗ України, 2011.

103. https://www.youtube.com/watch?v=vR_MvDZ8qVE&list=RDMMvR_MvDZ8qVE&start_radio=1 Використання профхімії на підприємствах відповідно до стандарту ХАССП.

104. https://dezplus.com.ua/catalogue/disinfection/pre-sterilized-cleansing/pre-sterilized-cleansing_48.html Дезинфицирующие средства и изделия медицинского назначения Биомой.

105. Винаров А.Ю., Кухаренко А.А., Панфилов В.И. Лабораторные и промышленные ферментеры: Учеб. пособие, – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева. – 2004. – 97 с.

106. <https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor.pdf> Державний реєстр дезінфекційних засобів 2020 рік.
107. <http://www.cnhepa.com/cardboard-separator-hepa-filter-p53.html> Повітрозабірник ainer deltafan.
108. <https://ventbazar.ua/tsentrobezhenyi-ventilyator-vents-vtsun-225kh103-22-2-pr.html> VENTBAZAR. Центробежный вентилятор ВЕНТС ВЦУН 225x103-2,2-2 ПР.
109. http://paskal.ua/ua/product/teploobmenik-whe-2040_171.html PASKAL. Теплообмінник WHE 2040.
110. https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php Galactic manufacturing company. Система підігріву повітря.
111. <https://tehnofilter.ub.ua/goods/view/6364274/all/filtr-tonkogo-ochishchennya-povitrya-ftov-nera-hepa/> ТЕХНОФИЛЬТР. Фільтр тонкого очищення повітря (HEPA).
112. <https://ventbazar.ua/filtr-kassetnyi-aerostar-sfb-40-20.html> Фільтр кассетный Aerostar SFB 40-20
113. http://gk-sk.ru/kompressory/katalog/Atlas_Copco-model-GA_7_FF/ Компрессор Atlas Copco модель: GA 7 FF.
114. <https://kompressormash.com/p/142218945-vosduhosbornik-resiver-r-200-500-200-l/> Восдухосборник (ресивер) Р 200.500 (200 л).
115. <https://ventbazar.ua/filtr-vozdushnyi-vents-fbk-700kh400-7.html> Фільтр воздушный ВЕНТС ФБК 700X400-7.
116. <http://www.cnhepa.com/cardboard-separator-hepa-filter-p53.html> Картонний сепаратор HEPA-фільтр.
117. <http://sartorius-sd.com.ua/index.php/.html> Феникс СД. Starius. Ферментер/Биореактор из нержавеющей стали для вашей лаборатории.
118. <https://aurora-pack.ru/catalog/sku/reaktor-s-meshalkoy-i-rubashkoy-podogreva-emk-r-20/> Реактор с мешалкой и рубашкой подогрева ЕМК Р-20.

119. <https://aurora-pack.ru/catalog/sku/reaktor-s-meshalkoy-i-rubashkoy-podogreva-emk-r-20/> АзовХимСервис. Реактор из нержавеющей стали 25 литров.
120. <https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/pilotnyie-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus%C2%AE/pilotnyie-fermenteryi.html> BIORUS. Пилотные ферментеры.
121. <https://prom.ua/p61894129-dozator-vesovoj-ploschadchnyj.html> Дозатор весовой площадочный (100 гр-10 кг).
122. <https://perryvidex.eu/product/150-ltr-3-bar-int-3-bar-jkt-agit-U2040-2> PERRY VIDEX. 150 лтр б/у СЕМАР АГ (Швейцария) нержавеющей реактор/ферментер рабочий объем 150 литров давление 3 бар температура 130 градусов.
123. https://www.stroy-union.ru/i_store/item_517262/smesiteli-reaktory-tihohodnaya-meshalka.html Смесители-реакторы (тихоходная мешалка).
124. <https://mash-him.ru/apparaty-s-peremeshivayushhimi-ustrojstvami> МашХим. Центр Химического Машиностроения.
125. https://www.pumpcentre.com.ua/peristalticheskij-nasos-b3-v-12-1-90-260v?gclid=CjwKCAjwgZuDBhBTEiwAXNofRC8gf3YgM21IWFGzflDw_XF1I_oQb_ZDxCIPkQ8qJ36XhvP8maYybmBoC4NEQAvD_BwE Pump Centre. Перистальтический насос В3-V 12-1 90-260V.
126. <https://megawatt.dn.ua/ua/p257257990-tsentrobezhnyj-nasos-jex.html> Центробежный насос JEX 750 «Насосы+».
127. <https://russian.alibaba.com/product-detail/specialized-bioreactors-pulsed-types-of-anaerobic-bioreactors-fermenters-transgenic-plants-as-bioreactors-cell-62320980706.html?spm=a2700.8699010.normalList.56.58796582nN4hH8> Specialized bioreactors pulsed, Types of anaerobic bioreactors fermenters, Transgenic plants as bioreactors cell.
128. <https://www.olx.ua/d/obyavlenie/prodam-reaktory-s-meshalkoy-i-rubashkoy-v63l-100l-160l-IDCCKQ8.html> Реактор змішувач об'ємом 160 л.

129. <http://snpo.ua/ru/produkts/tsentrifugi/tsentrifugi-osaditelnye-filtruyushhie-i-kombinirovannye-so-shnekovoj-vygruzkoj-osadka/> Сумское НПО. Центрифуги.
130. <https://prom.ua/p941157880-reaktor-himicheskij-steklyannyj.html> Реактор-змішувач 20 л.
131. <https://minipress.ru/katalog/sublimatsionnye-liofilnye-vakuumnye-sushki/vakuumnaya-liofilnaya-sublimatsionnaya-sushilka-rl-05/> MINIPRESS.RU. Вакуумная лиофильная сублимационная сушилка RL-05.
132. <https://chumaki.in.ua/p606012619-izmelchitel-yf8-melnitsa.html> Чумаки в Китае. Измельчитель YF8-1 Мельница молотковая дробилка.
133. <https://minipress.ru/katalog/eksperimentalnoe-oborudovanie/vibratsionnye-sita-proseivaniya-poroshka/promyshlennoe-vibratsionnoe-sito-vs-04/> MINIPRESS.RU. Промышленное вибрационное сито VS-04.
134. <https://effler.kz/p4543274-mashina-dlya-napolneniya.html> EFFLER pharma. Машина для наполнения капсул ZANASI and ZANASI PLUS.
135. <https://prom.ua/ua/p540214557-farmatsevticheskij-schetchik-kapsul.html?&primelead=MC4xNQ> Чумаки в Китаї. Фармацевтичний лічильник капсул та пігулок CDR-5A
136. <https://aurora-pack.ru/catalog/sku/avtomaticheskaya-kartonazhnaya-mashina-na-pet-flakon-akm-6000/> AURORA. Автоматическая картонажная машина для упаковки ПЭТ-флаконов в коробки АКМ-6000.
137. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв: консп. лекцій / В.О. Красінько.– К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
138. <http://farmaktiv.com.ua/index.php/ua/proizvodstvo/tioglikoleve>. Фармактив. Тіогліколеве середовище.
139. Панов Є.М. Основи технічної мікробіології: метод. вказ. до лаб. робіт / Є.М. Панов. – К.: КПІ, 2007. – 41 с.

140. <http://docs.cntd.ru/document/1200049293>. Методические указания по лабораторному контролю качества продукции общественного питания .1991 N 1-40/3805.

141. Методы биохимии растительных продуктов. Петров К.П. Киев, «Вища школа», 1978, 224 с.

142. <http://www.eurasiancommission.org/ru/act/texnreg/deptexreg/LS1/Documents/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%20%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%BE%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%BE%D0%B3%D0%BE%20%D1%82%D0%B8%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D1%8F.pdf> Общая фармакопейная статья. Метод формольного титрования.

143. Осолодченко Т.П., Ніколаєнко В.М., Божко М.Г. Розробка методів трансформації відходів гамаглобулінового виробництва у форму, доступну для мікроорганізмів. Аналі Мечниковського Інституту, №1, 2005.17-21 с.

144. <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-3-0022-15-opredelenie-aminnogo-azota-metodami-formolnogo-i-jodometriceskogo-titrovaniya/> ОФС.1.2.3.0022.15 Определение аминного азота методами формольного и йодометрического титрования. Общая фармакопейная статья.

145. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Доповнення 1. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. — 360 с. ISBN 978-966-97390-2-5

146. Ельперін І.В. Автоматизація та управління біотехнологічним виробництвом: Метод. рекомендації до виконання індивідуального завдання з дисципліни для студентів освітнього ступеня бакалавр за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» всіх форм навчання. /Уклад: І.Ельперін – К.: НУХТ, 2017. – 44 с.

147. Болтянський О.В., Мовчан С.І., Болтянська Н.І. Знезараження та регенерація відпрацьованих миючих розчинів. *Праці ТДАТУ*. 2017, 17 (3): 99-105.

148. Волкова Е.М., Якимчук Е.И., Соколюк Я.А. Эффективность биотехнологических методов очистки сточных вод. *Аграрная наука-сельскому хозяйству*. 2012, 321-323.

149. http://www.biotechnolog.ru/prombt/prombt12_2.htm Биотехнология. Раздел «Промышленная биотехнология».

150. Гарапшин Д.Д., Федоров Г.Ю. Очистка сточных вод с использованием биологических фильтров. *Вестник магистратуры*. 2016, №1(52). Т.1.

151. Сурков А.А., Махлес Р.М., Глушанкова И.С., Дьяков М.С. Термическая переработка полимерных отходов с получением жидкого топлива и наносорбционных углеродных материалов. *Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе*. 2011, № 7.

152. Сурков А.А., Балабенко Н.А., Глушанкова И.С. Утилизация полимерных отходов полипропилена и поликарбоната с получением углеродных сорбентов. *Вестник ПНИПУ. Урбанистика*. 2012. №1: 89-96.

153. <http://logopaket.ru/statji/piroliz-kak-metod-pererabotki-plastika>
Пиролиз, как метод переработки пластика.

154. Апостолюк С.О., Джигирей В.С., Соколовський І.А. Промислова екологія: навч. посіб.— 2-ге вид., випр, і допов.— К., 2012. — 430 с.



In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk

Francisco J. Pérez-Cano^a, Honglin Dong^b, Parveen Yaqoob^{b,*}

^a Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain

^b Department of Food and Nutritional Sciences, The University of Reading, Whiteknights, PO Box 226, Reading RG6 6AP, UK

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 October 2009
Received in revised form
29 January 2010
Accepted 29 January 2010

Keywords:
Breast milk
Cytokines
Lactobacillus
Lymphocyte
Probiotic

ABSTRACT

Commensal bacteria, including some species of lactobacilli commonly present in human breast milk, appear to colonize the neonatal gut and contribute to protection against infant infections, suggesting that lactobacilli could potentially modulate immunity. In this study, we evaluated the potential of two *Lactobacillus* strains isolated from human milk to modulate the activation and cytokine profile of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) subsets *in vitro*. Moreover, these effects were compared to the same probiotic species of non-milk origin. *Lactobacillus salivarius* CECT5713 and *Lactobacillus fermentum* CECT5716 at 10^5 , 10^6 and 10^7 bacteria/mL were co-cultured with PBMC (10^7 /mL) from 8 healthy donors for 24 h. Activation status (CD69 and CD25 expressions) of natural killer (NK) cells (CD56⁺), total T cells (CD3⁺), cytotoxic T cells (CD8⁺) and CD4⁺ T cells was determined by flow cytometry. Regulatory T cells (Treg) were also quantified by intracellular Foxp3 evaluation. Regarding innate immunity, NK cells were activated by addition of both *Lactobacillus* strains, and in particular, the CD8⁺ NK subset was preferentially induced to highly express CD69 (~90%, $p < 0.05$). With respect to acquired immunity, approximately 9% of CD8⁺ T cells became activated after co-cultivation with *L. fermentum* or *L. salivarius*. Although CD4⁺ T cells demonstrated a weaker response, there was a preferential activation of Treg cells (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) after exposure to both milk probiotic bacteria ($p < 0.05$). Both strains significantly induced the production of a number of cytokines and chemokines,

of this study was to investigate the effects of *L. fermentum* CECT5716 and *L. salivarius* CECT5713 on specific components of innate and acquired immunity in an *in vitro* human cell model.

Materials and methods

Preparation of bacteria

L. fermentum CECT5716 and *L. salivarius* CECT5713 were kindly provided by Puleva Biotech SA (Granada, Spain). Both strains were grown in **Man-Rogosa-Sharpe (MRS)** agar and **broth medium** (Oxoid, Basingstoke, UK) at **37 °C in an anaerobic cabinet** (Don Whitley Scientific, Shiplay, UK) **under 10% H₂; 10% CO₂; 80% N₂ conditions**. Specific bacterial growth curves, i.e. correspondence between the optical density at 620 nm (OD₆₂₀) and colony-forming units (CFU), were developed for each strain. Bacteria were subsequently collected when their OD₆₂₀ during the log phase corresponded to **1×10^9 cell/mL**. Harvested cells were washed twice with sterile phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at low speed (800 g, 10 min). The final working concentration in medium (Roswell Park Memorial Institute; RPMI 1640) was adjusted to **1×10^8 , 1×10^7 and 1×10^6 cells/mL**. Two *Lactobacillus* strains of non-milk origin were included in some experiments; *L. fermentum* NCIMB701751 and *L. salivarius* NCIMB11795 which were originally derived from saliva (NCIMB, Scotland, UK).

Subjects and cell preparation

Blood samples were taken from 8 healthy volunteers aged 25–34 years (3 males and 5 females) in sodium heparin vacutainer tubes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by layering blood over an equal volume of Fycoll density gradient (Lympholyte[®]-H, Cedarlane, Ziereikzee, The Netherlands) and centrifuging at 1000 g for 20 min. Cells collected at the interface were washed with PBS and the Lympholyte separation repeated to achieve a lower degree of contamination with erythrocytes. After washing the cells with RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Autogen Bioclear Ltd., Wiltshire UK) containing 2 mM L-glutamine (Sigma), cells were counted

conjugated anti-CD8 α (RPA-18), anti-CD3 (UCHL1), anti-CD4 (RPA-T4) and PercP anti-CD56 (B159) mAb, all obtained from BD Biosciences (Oxford, UK). For intracellular staining of Foxp3, PCH101 clone mAb from eBioscience Ltd. (Haltfield, UK) was used. Briefly, cell surface staining was performed as follows. Cells were incubated with a mixture of saturating concentrations of FITC-, PE- and PercP-conjugated mAb at 4 °C in the dark for 20 min. Stained cells were washed with PBS and fixed with 0.5% p-formaldehyde (BD Biosciences) and stored at 4 °C in the dark until analysis by flow cytometry. For Foxp3, after extracellular staining, cells were fixed, permeabilized (60 min at 4 °C), and washed before incubating with anti-Foxp3-PercP for 30 min at 4 °C in the dark. Cells were washed again and finally fixed. Analyses were performed with a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson Corp., Hialeah, USA). Phenotypical results were expressed as the percentage of positive cells with respect to the total number of gated lymphocytes or with respect to a particular cell subset (i.e. NK cells or T cells).

Cytokine screening by proteome profiler array

For preliminary screening of PBMC cytokines induced by bacteria we used a semi-quantitative method to simultaneously profile the relative levels of 32 selected cytokines and chemokines (CSa, CD40L, G-CSF, GM-CSF, GXC1.1, 8 and 10–12, CCL1–CCL5, sICAM-1, IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1 γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-16, IL-17, IL-17E, IL-23, IL-27, IL-32 α , MIF, Serpin E-1, TNF α). Briefly, a representative sample for each stimulatory condition (control cultured PBMC, LPS-stimulated PBMC, and bacteria stimulated PBMC at a 1:1 ratio) were incubated overnight at 2–8 °C on a rocking platform in a nitrocellulose membrane with the specific capture and detection antibodies (Proteome Profiler[™] Array with human cytokine array panel A, R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, UK). After washing, streptavidin-HRP was added and after 30 min incubation, the nitrocellulose was exposed to ECL reagent (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) for 2 min. In a dark room, membranes were exposed to hyperfilm for 2 min in an autoradiographic cassette and developed for 5 min. Protein spots were quantified using Quantity One v4 software (Bio Rad, Hertfordshire, UK).

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 528 862** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013118084/10, 19.04.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.04.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 19.04.2013

(45) Опубликовано: 20.09.2014 Бюл. № 26

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2391395 C1, 10.06.2010 . RU 2376366 C2, 20.12.2009 . RU 2326938 C2, 20.06.2008 . US 20080233091 A1, 25.09.2008 . ARROYO R. ET AL. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of Lactobacilli isolated from breast milk // Clin Infect Dis. 2010 Jun 15;50 (12):1551-8

Адрес для переписки:

105554, Москва, ул. Первомайская, 74, кв. 38,
Агранович А.М.

(72) Автор(ы):

Абрамов Вячеслав Михайлович (RU),
 Хлебников Валентин Сергеевич (RU),
 Пчелинцев Сергей Юрьевич (RU),
 Косарев Игорь Васильевич (RU),
 Карлышев Андрей Владимирович (RU),
 Василенко Раиса Николаевна (RU),
 Мельников Вячеслав Геннадьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Абрамов Вячеслав Михайлович (RU),
 Хлебников Валентин Сергеевич (RU),
 Пчелинцев Сергей Юрьевич (RU),
 Косарев Игорь Васильевич (RU),
 Карлышев Андрей Владимирович (RU),
 Василенко Раиса Николаевна (RU),
 Мельников Вячеслав Геннадьевич (RU)

(54) **ШТАММ *Lactobacillus fermentum*, ОБЛАДАЮЩИЙ ШИРОКИМ СПЕКТРОМ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ПРОБИОТИЧЕСКИЙ КОНСОРЦИУМ ЛАКТОБАКТЕРИЙ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии. Предложен штамм *Lactobacillus fermentum* ВКМ В-2793D, обладающий антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. Также предложен консорциум штаммов *Lactobacillus fermentum* ВКМ В-2793D, *Lactobacillus crispatus* ВКМ В-2727D, *Lactobacillus gasseri* ВКМ В-2728D, *Lactobacillus plantarum* ВКМ В-273D, обладающий пробиотическим действием и используемый для изготовления бактериальных

препаратов и кисломолочных продуктов функционального питания. Консорциум обладает более высокой антагонистической активностью к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам по сравнению с отдельными штаммами лактобацилл, входящими в его состав. Группа изобретений позволяет расширить ассортимент пробиотических штаммов, а также средств для профилактики и лечения маститов у кормящих грудью матерей. 2 ил. ф-лы, 1 ил., 5 табл., 12 пр.

RU 2 528 862 C1

RU 2 528 862 C1

RU 2528 862 C1

94°C × 30 сек; 30°C × 30 сек, 72°C × 1 мин 30 сек; последующие 43 цикла - 94°C × 5 сек, 30°C × 30 сек и 72°C × 1 мин 30 сек; окончательная элонгация - 7 мин при 72°C. Анализ продуктов ПЦР проводят при помощи электрофореза в 1.5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием при напряженности поля 6 В/см.

5 Результаты, приведенные на фиг.1, показывают, что спектры, полученные на ДНК изолятах *Lactobacillus fermentum*, выделенных из грудного молока, кала ребенка, вагинального секрета и кала матери, сходны по числу и размеру фрагментов, что свидетельствует об их полной идентичности. Все четыре изолята представляют собой штамм *Lactobacillus fermentum* 3872, который может обитать в различных биотопах экологической системы «мать-дитя».

10 Чувствительность к антибиотикам.

Штамм *L.fermentum* 3872 устойчив к метронидазолу и ципрофлоксацину.

Способ, условия и состав сред для размножения штамма.

15 Штамм *Lactobacillus fermentum* 3872 выращивают при 37±2°C на жидкой среде МРС или в обезжиренном молоке (0,01-0,03% жира).

Коммерчески приобретенное обезжиренное молоко (0,01-0,03% жира) стерилизуют 20 минут автоклавированием при давлении 0.5 атм и температуре 110°C.

Для выращивания индивидуальных колоний штамма используют агаризованную среду МРС, содержащую 1,4% агара (Difco, США).

20 Способ, условия и состав сред для хранения штамма

Штамм *Lactobacillus fermentum* 3872 может храниться:

- в стерильном обезжиренном молоке при 4°C с периодическим пересевом 1 раз в 15-20 дней;

25 - в лиофилизированном состоянии в запаянных ампулах (защитная среда при высушивании - сахара 10%, pH 7,0 или стерильное обезжиренное молоко) в течение 2-х лет при температуре 4°C;

- в замороженном виде при -70°C. Длительность хранения 6 месяцев.

Штаммы *Lactobacillus crispatus* 2029, *Lactobacillus gasseri* 2016, *Lactobacillus plantarum* 2025, входящие в заявляемый консорциум наряду со штаммом *Lactobacillus fermentum*

30 3872, выделены из влагалища здоровых женщин репродуктивного возраста, идентифицированы методом секвенирования гена 16S rRNA и депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (Московская обл., г. Пушкино) под следующими регистрационными номерами:

35 Штамм *Lactobacillus crispatus* 2029 имеет регистрационный номер ВКМ В-2727D;

Штамм *Lactobacillus gasseri* 2016 имеет регистрационный номер ВКМ В-2728D;

Штамм *Lactobacillus plantarum* 2025 имеет регистрационный номер ВКМ В-2731D.

Штаммы *Lactobacillus crispatus* 2029, *Lactobacillus gasseri* 2016, *Lactobacillus plantarum* 2025 характеризуются следующими признаками.

40 Культурально-морфологические признаки.

При выращивании на поверхности агаризованной среды МРС pH-6,5 (Himedia, Индия)

методом истощающего штриха в термостате при 37°C в течение 24-48 часов:

- штамм *Lactobacillus crispatus* 2029 - колонии средние, бледно-белые, круглые, плоские с ровным краем,

45 - штамм *Lactobacillus gasseri* 2016 - колонии мелкие, бледно-белые, круглые, плоские

RU 2528 862 C1

Пример 1. Культивирование штамма *Lactobacillus fermentum* 3872 в лабораторных условиях.

Для получения посевного материала в ампулу, содержащую 10 мг лиофилизированной культуры *Lactobacillus fermentum* 3872, добавляют 0,5 мл стерильного раствора натрия хлорида 0,9% и выращивают культуру на поверхности агаризованной среды МРС 5 методом истощающего штриха в термостате при 37°C в течение 18 часов. Затем изолированную колонию помещают в бактериологическую пробирку, содержащую 7 мл жидкой среды МРС и выращивают в термостате при 37°C в течение 15 часов.

10 Полученный посевной материал в количестве 1% вносят во флаконы, содержащие 500 мл жидкой среды МРС и выращивают при 37°C в течение 18 часов. Титр полученной культуры $2,0 \times 10^9$ КОЕ/мл. Путем доведения концентрации клеток до $6,0 \times 10^8$ КОЕ/мл получают стандартизованную стартовую биомассу штамма *Lactobacillus fermentum* 3872.

15 Для длительного хранения клетки освобождают от компонентов среды выращивания путем центрифугирования, переводят в среду высушивания (защитная среда при высушивании - стерильное обезжиренное молоко), расфасовывают по 1 мл в пенициллиновые флаконы и лиофилизируют. В лиофильно высушенном состоянии стартовая биомасса может храниться в течение двух лет при температуре 4°C.

20 Пример 2. Получение бактериального препарата консорциума штаммов *Lactobacillus fermentum* 3872, *Lactobacillus crispatus* 2029, *Lactobacillus gasseri* 2016, *Lactobacillus plantarum* 2025.

Lactobacillus fermentum F6 的增殖培养基优化及高密度发酵的研究张兴昌¹, 陈霞¹, 周琦¹, 曹宏芳¹, 高鹏飞², 张和平^{1*}

(1 内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 内蒙古呼和浩特 010018; 2 内蒙古轻工科学研究所有限责任公司, 内蒙古呼和浩特 010050)

摘要: 对分离自少数民族传统乳制品中的 *Lactobacillus fermentum* F6 菌种的增殖培养基进行优化, 并对其高密度发酵条件进行探索。通过测定不同组成培养基中菌体在 600 nm 波长下的光密度和发酵液在不同发酵条件下的活菌数, 得到最适增殖培养基配方及其高密度发酵条件。增殖培养基配方为: 蔗糖 62.0 g/L、酵母粉 35.5 g/L、大豆蛋白胨 12.0 g/L、柠檬酸 1.35 g/L、柠檬酸钠 22 g/L、MgSO₄·7H₂O 2 g/L、MnSO₄·5H₂O 100 mg/L、Tween-80 1 g/L。在 5 L 发酵罐中, *Lactobacillus fermentum* F6 经优化发酵条件, 其活菌数可达到 2.30×10^{10} CFU/mL, 加入保护剂经冷冻干燥后活菌数可达到 1.45×10^{11} CFU/g, 存活率为 79.11%。中试培养液中活菌数可达 1.02×10^{10} CFU/mL, 存活率为 58%。以上优化的增殖培养基和高密度发酵条件为 *Lactobacillus fermentum* F6 的工业化生产奠定了基础。

关键词: 发酵乳杆菌 F6; 增殖培养基; 高密度发酵; 中试

中图分类号: Q939.11[†]

文献标识码: A

文章编号: 1671-5187(2010)03-0101-07

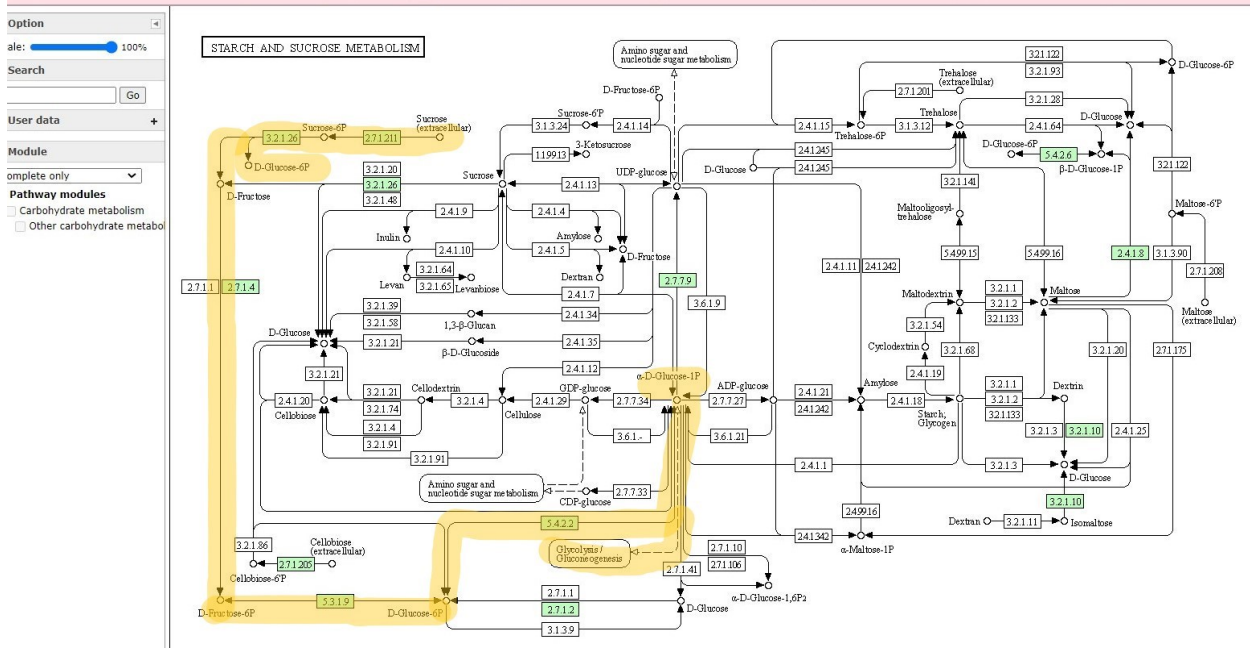
Study on the Optimization of Enrichment Medium of *Lactobacillus fermentum* F6 and its High-density Cultivation

Zhang Xingchang¹, Chen Xia¹, Zhou Qi¹, Cao Hongfang¹, Gao Pengfei², Zhang Heping^{1*}

(1 Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot of Inner Mongolia 010018, China; 2 Inner Mongolia Light Industry Research Institute Co., Ltd, Hohhot of Inner Mongolia 010050, China)

Abstract: To optimize the enrichment medium components and the high-density cultivation procedure of *Lactobacillus fermentum* F6, this was isolated from traditional dairy products of minority nationalities. Detected OD₆₀₀ (optical density under 600 nm) in different medium and bacterial colonies were counted under different high-density cultivation conditions. The composition of enrichment medium for *Lactobacillus fermentum* F6 was as follows: sucrose 62.0 g/L, yeast extract 35.5 g/L, soy peptone 12.0 g/L, citric acid 1.35 g/L, citrate sodium 22 g/L, MgSO₄·7H₂O 2 g/L, MnSO₄·5H₂O 100 mg/L, and Tween-80 1.0 g/L. After high-density cultivation in enrichment medium with optimized conditions, the living cells of fermentation broth and powder were 2.30×10^{10} CFU/mL and 1.45×10^{11} CFU/g, respectively. The survival rate after freeze-drying with cryoprotector was 79.11%. The count of living cells in fermentation broth of pilot plant scale test could reach to 1.02×10^{10} CFU/mL, the survival rate was 58%. The result can provide some useful data to the industrial application of *Lactobacillus fermentum* F6.

Key words: *Lactobacillus fermentum* F6, enrichment medium, high-density cultivation, pilot plant scale test



KEGG Pentose phosphate pathway - Lactobacillus fermentum F-6

[Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Show description | Image (png) file | Help]

Change pathway type

